Učestalost, značajke i klinička važnost neuobičajenih obrazaca indirektne imunofluorescencije autoprotutijela na HEp-2 stanicama

Tomić Sremec, Nada

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:432533

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Nada Tomić Sremec

Učestalost, značajke i klinička važnost neuobičajenih obrazaca indirektne imunofluorescencije autoprotutijela na HEp-2 stanicama

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Nada Tomić Sremec

Učestalost, značajke i klinička važnost neuobičajenih obrazaca indirektne imunofluorescencije autoprotutijela na HEp-2 stanicama

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena u Odjelu za laboratorijsku imunologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Drago Batinić, dr. med.
prof. dr. sc. Branimir Anić, dr. med.

SADRŽAJ

1. Uvod.....1

1.1. Antinuklearna protutijela (ANA) - definicije.....1

1.2. Povijest i perspektive dijagnostike ANA.....1

1.3. Etiologija i patogeneza ANA.....3

1.3. Uloga ANA u dijagnostici bolesti.....5

1.3.1. Sistemski eritemski lupus.....5

1.3.2. Sjögrenov sindrom.....6

1.3.3. Sistemska skleroza.....7

1.3.4. Miješana bolest vezivnog tkiva.....8

1.3.5. Dermatomiozitis i polimiozitis.....9

1.3.6. Druge autoimunosne bolesti.....9

1.4. Pojavnost ANA kod neimunosnih bolesti i zdravih pojedinaca.....10

1.5. Prednosti i mane metode zlatnog standarda za dijagnostiku ANA.....11

1.6. Obrasci imunofluorescencije.....13

1.6.1. Konsenzus ICAP.....13

1.6.2. Obrasci fluorescencije i njihova važnost.....15

1.6.2.1. Jezgreni obrasci imunofluorescencije.....16

1.6.2.2. Citoplazmatski obrasci imunofluorescencije.....27

1.6.2.3. Mitotski obrasci imunofluorescencije.....34

2. Hipoteza.....37

3. Ciljevi.....38

3.1. Opći cilj.....38

3.2. Specifični ciljevi.....38

4. Materijali i metode.....39

4.1. Uzorci uključeni u analize.....39

4.2. Postupanje s uzorcima.....40

4.3. Analiza antinuklearnih protutijela.....41

4.3.1. Indirektna imunofluorescencija na HEp-2 stanicama.....41

4.3.2. Analiza specifičnih protutijela.....42

4.4. Kliničke dijagnoze.....43

4.5. Statističke metode.....44

4.6. Odobrenja.....44

5. Rezultati.....45

5.1. Obilježja ispitivane i kontrolne skupine.....45

5.2. Obilježja pojedinih rijetkih obrazaca fluorescencije.....52

5.3. Učestali obrasci u kontekstu rijetkih obrazaca imunofluorescencije.....114

6. Rasprava.....118

6.1. Demografske karakteristike ispitanika s rijetkim obrascima imunofluorescencije.....118

6.2. Povezanost rijetkih obrazaca imunofluorescencije i specifičnih protutijela.....121

6.3. Povezanost rijetkih obrazaca imunofluorescencije i kliničkih dijagnoza.....128

6.4. Rijetki obrasci u kontekstu učestalih obrazaca imunofluorescencije.....131

6.5. Ograničenja studije i buduće perspektive.....133

7. Zaključci.....135

8. Sažetak.....138

9. Abstract.....139

10. Literatura.....140

11. Životopis.....163

KRATICE

AC - engl. *anti-cell*

ANA - antinuklearna protutijela (prema engl. *antinuclear antibodies*)

CENP-B - bjelančevina centromera B (prema engl. *centromere protein B*)

CENP-F - bjelančevina centromera F (prema engl. *centromere protein F*)

CIDP - kronična upalna demijelinizirajuća polineuropatija (prema engl. *chronic inflammatory demyelinating polineuropathy*

DFS - gusti fino granulirani (prema engl. *dense fine speckled*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. *deoxyribonucleic acid*)

dsDNA - dvolančana deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. *double stranded deoxyribonucleic acid*)

EASI - Europska inicijativa za standardizaciju autoimunosti (prema engl. *European Autoimmunity Standardisation Initiative*)

ELISA - engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*

ENA - ekstraktibilni jezgreni antigeni (prema engl. *extractable nuclear antigens*)

FITC - fluorescein-izotiocijanat (prema engl. *fluorescein isothiocyanate*)

HEp-2 - ljudski epitelni tip 2 (prema engl. *human epithelial type 2*)

HIV - virus ljudske imunodeficijencije (prema engl. *human immunodeficiency virus*)

hUBF - ljudski uzvodni vezujući čimbenik (prema engl. *human upstream binding factor*)

ICAP - engl. *International Consensus on Antinuclear Antibody (ANA) Patterns*

IF - imunofluorescencija

IIF - indirektna imunofluorescencija

IWAA - engl. *International Workshop on Autoimmunity and Autoantibodies*

LEDGF - čimbenik rasta dobiven iz epitela leće (prema engl. *lens epithelium-derived growth factor*)

MCTD – miješana bolest vezivnog tkiva (prema engl. *mixed connective tissue disease*)

mRNA - glasnička ribonukleinska kiselina (prema engl. *messenger ribonucleic acid*)

NOR - područje organizacije jezgrice (prema engl. *nucleolus organizer region*)

NuMA - jezgreni mitotski sklop (prema engl. *nuclear mitotic apparatus*)

PBC - primarni bilijarni kolangitis (prema engl. *primary billiary cholangiitis*)

PBS - fiziološka otopina puferirana fosfatom (prema engl. *phosphate buffered saline*)

PCNA - jezgreni antigen proliferirajućih stanica (prema engl. *proliferating cell nuclear antigen*)

PE - fikoeritrin (prema engl. *phycoerythrine*)

SLE - sistemski eritemski lupus (prema engl. *systemic lupus erythematosus*)

Sm - Smith

SMN - bjelančevina preživljenja motornog neurona (prema engl. *survival of motor neuron protein*)

snRNP - mali jezgreni ribonukleoprotein (prema engl. *small nuclear ribonucleoprotein*)

SRP - čestica za prepoznavanje signala (prema engl. *signal recognition particle*)

SS-A - engl. *Sjögren syndrome A*

SS-B - engl. *Sjögren syndrome B*

ssDNA - jednolančana deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. *single stranded deoxyribonucleic acid*)

TNF-α - čimbenik nekroze tumora alfa (prema engl. *tumor necrosis factor alpha*)

TRIM21 - bjelančevina koja sadržava trodijelni uzorak 21 (prema engl. *tripartite motif-containing protein 21*)

tRNA - prijenosna ribonukleinska kiselina (prema engl. *transfer ribonucleic acid*)

U1-RNP - U1-ribonukleoprotein (prema engl. *U1 ribonucleoprotein*)

1. Uvod

1.1. Antinuklearna protutijela (ANA) – definicije

Pod pojmom antinuklearnih protutijela, usprkos njihovu nazivu, ne podrazumijevamo samo protutijela usmjerena na antigene jezgara vlastitih stanica, nego protutijela usmjerena na sve unutarstanične komponente. Ovaj povijesni naziv, koji se u početku razvoja dijagnostike autoimunosnih bolesti uistinu odnosio samo na tada poznata protutijela za koja se smatralo da prepoznaju antigene smještene u jezgri (1), s razvojem je znanstvenih spoznaja proširen i na neke dodatne entitete. Sukladno tome, testiranje na prisutnost antinuklearnih protutijela podrazumijeva detekciju protutijela usmjerenih na ekstraktabilne nuklearne antigene (ENA, prema engl. *extractable nuclear antigens*), što je pojam koji se odnosi na određene bjelančevine pretežno smještene u jezgri, a koje se mogu ekstrahirati iz jezgre primjerenim laboratorijskim metodama (2). Uz navedene antigene, protutijela koja podrazumijevamo pod pojmom ANA mogu biti usmjerena i na druge antigene smještene u jezgri, ali i antigene prisutne u citoplazmi. S obzirom na različit smještaj antigena te preklapajuću i donekle zbunjujuću nomenklaturu ovih protutijela, može doći do nedoumica oko tumačenja laboratorijskih nalaza koji se odnose na ova protutijela. Stoga su neki autori u upotrebu uveli pojam protutijela usmjerenih na stanične antigene (3). Daljnji razvoj spoznaja o ovim protutijelima i standardizacija nomenklature trebali bi u budućnosti dovesti do smanjenja nedoumica povezanih s kliničkim i laboratorijskim praćenjem i tumačenjem nalaza ovih protutijela.

1.2. Povijest i perspektive dijagnostike ANA

Suvremena dijagnostika ANA vuče korijene još iz sredine prošlog stoljeća kada je uspostavljena besmrtna linija stanica HEp-2 podrijetlom iz laringealnog karcinoma. Početni uzorak tih stanica pribavljen je od bolesnika 1951. godine, a sama linija stanica opisana je po prvi puta 1954. godine (4). Međutim, već u idućem je desetljeću pokazano da se stanice ove linije zapravo sastoje od stanica cervikalnog adenokarcinoma, što se objašnjavalo kontaminacijom stanicama HeLa linije (5), koja je kasnije i potvrđena (6), uz dokaze da je u uzorcima prisutan genski materijal humanog papiloma virusa. Ova zabluda veći je problem u istraživanjima koja se bave laringealnim karcinomom, dok nema većeg utjecaja na

istraživanja protutijela usmjerenih na stanične antigene ili na rutinsku dijagnostiku koja koristi tu staničnu liniju kao supstrat (7).

Nedugo nakon što je uspostavljena stanična linija HEp-2, istraživanja su upozorila na reaktivnost tada još nepoznatih „serumskih faktora“ sa staničnim jezgrama i jezgrenim bjelančevinama u krvi ispitanika sa sistemskim eritemskim lupusom (SLE, prema engl. *systemic lupus erythematosus*) i određenim drugim stanjima (8). Ti su faktori u slučaju SLE identificirani kao protutijela usmjerena na deoksiribonukleoprotein (9). Ova su istraživanja nastavljena na ranije otkriven LE fenomen koji se odnosio na neutrofilnu ili makrofagnu nukleofagocitozu u bolesnika sa SLE (10). Ubrzo je postalo jasno da je imunofluorescencija, osobito neizravna (IIF, prema engl. *indirect immunofluorescence*), primjerena metoda za dijagnostiku takvih protutijela (11,12), a ta je metoda i danas neizostavna metoda u dijagnostici autoimunosnih bolesti.

Do mogućnosti utvrđivanja specifičnosti protutijela uočenih imunofluorescentnim metodama prošlo je oko 20 godina, kada je utvrđena povezanost s protutijelima usmjerenih na dvostruku uzvojnicu deoksiribonukleinske kiseline (anti-dsDNA prema engl. *double-stranded deoxyribonucleic acid*) (13). U tom su trenutku sve važniju ulogu u dijagnostici ovih protutijela počeli zauzimati testovi temeljeni na čvrstoj fazi, od kojih je najčešće zastupljena ELISA (prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) (14). Ubrzo su otkrivena i protutijela na druge nuklearne antigene i pripadajuće metode testiranja iz ove skupine (15-17). S vremenom se razvija mogućnost provođenja istodobnog testiranja na prisutnost više protutijela, bilo u obliku mikrotočkica na određenoj fiksnoj podlozi (18), bilo kao vrsta linearnog imunoblot-sustava temeljenog na tehnici Western blot (19,20). Ove vrste testova pokazale su se pouzdanima, ali ih se za sad nije uspjelo u potpunosti komercijalno iskoristiti (što u slučaju potonje metode nije u tolikoj mjeri izraženo) (21). Početkom ovog stoljeća razvijene su, međutim, suspenzijske metode i sustavi kojima se iz jednog uzorka s pomoću predefinirane mješavine antigena istodobno može odrediti predodređeni panel autoprotutijela (22-24). Nakon širokog prihvaćanja i uvođenja u upotrebu one su omogućile jednostavniji uvid u specifičnost protutijela u bolesnika u kojih je metodom IIF utvrđeno postojanje antinuklearnih protutijela. Sljedeći korak u razvoju, koji bi eliminirao manu limitiranog broja protutijela koja se istodobno mogu utvrditi ovim testovima, podrazumijevao bi istodobno testiranje na prisutnost barem 30 - 50 najčešćih protutijela koja se vezuju uz autoimunosne bolesti (25). U zadnje vrijeme u cilju kontrole troškova postoje i pokušaji automatiziranja

očitavanja IIF (26-29). No, takvi sustavi nisu još dovoljno pouzdani zbog složenosti definicije i polivalentnog kliničkog značaja ANA (30).

Usprkos razilazećim mišljenjima stručnjaka oko pogodnosti potpune zamjene IIF testa nekom od novorazvijenih metoda temeljenih na predefiniranoj mješavini antigena (31-33), konsenzus međunarodne skupine osnovane u svrhu standardizacije dijagnostike autoimunosnih bolesti (EASI, prema engl. *European Autoimmunity Standardisation Initiative*) navodi da je IIF na stanicama HEp-2 još uvijek metoda izbora u početnom probiru na prisutnost ANA (3).

1.3. Etiologija i patogeneza ANA

Uvriježeno je mišljenje o genezi ANA godinama od njihovog otkrića bilo nerazdvojivo povezano s etiopatogenezom reumatskih autoimunosnih bolesti. Naime, očigledni zaključak koji je proizašao iz činjenice da su ta protutijela prisutna u većine bolesnika s autoimunosnim bolestima bio je da su ta protutijela na neki način direktno odgovorna za pokretanje patogenetskih procesa i promoviranje oštećenja vlastitih stanica i tkiva (34,35). Ovi su zaključci logično proizlazili iz spoznaja na temelju istraživanja prototipa autoimunosnih reumatskih bolesti - SLE. Pokazalo se da su protutijela koja se ponajviše vezuju uz ovu bolest, protutijela anti-dsDNA, uistinu uključena u mehanizme oštećenja tkiva kroz stvaranje imunokompleksa, njihovo odlaganje u ciljnim tkivima, poput glomerularne membrane bubrega i posljedično izazivanje lokalne upale koja rezultira oštećenjem tkiva (36,37). Sukladno tome, pokazano je i da razine protutijela anti-dsDNA koreliraju s aktivnošću SLE, manifestiranom relapsom te da se njihovim praćenjem može pratiti i predvidjeti kliničko pogoršanje tijeka bolesti (38). Međutim, osim ovih protutijela, još su neka protutijela učestalo prisutna u bolesnika sa SLE, kao na primjer protutijela anti-Sm. Za razliku od protutijela anti-dsDNA, protutijela anti-Sm ne pokazuju varijacije tijekom bolesti niti se mogu dovesti u vezu niti s jednim njezinim obilježjem (39). Slična obilježja ima i većina drugih protutijela koja se dovode u vezu s autoimunosnim bolestima: nisu specifična za jednu određenu bolest nego se s različitom učestalošću pojavljuju u cijelom nizu sistemskih i organ-specifičnih autoimunosnih bolesti, njihovim se praćenjem i mjerenjem titra ne može predvidjeti promjena aktivnosti bolesti, a najčešće nisu povezana niti s oštećenjima pojedinih organa niti s razlikama u kliničkoj slici unutar pojedine autoimunosne bolesti (35).

Sve navedene činjenice potaknule su razvoj druge teorije o nastanku ANA koja je primjenjiva na većinu protutijela iz te skupine, s mogućom iznimkom ranije spomenutih protutijela anti-dsDNA. Prema toj teoriji, ANA nisu uključena u direktnu etiopatogenezu bolesti, nego su neka vrsta epifenomena, odnosno reakcije na autoimunosne procese koji se događaju u organizmu (40-44). Pri tome je ključni korak u njihovoj indukciji pojačano izlaganje staničnih i jezgrenih komponenata antigen-predočnim stanicama imunosnog sustava (45), što je pak posljedica promjena u apoptotskim procesima u organizmu (46). Proces apoptoze, koji je zadužen za programirano uklanjanje suvišnih ili nepovratno oštećenih stanica (47) može u kontekstu autoimunosne bolesti biti pojačan zbog oštećenja stanica u tkivima pogođenim bolešću ili zbog pokušaja imunosnog sustava da kontrolira vlastite autoreaktivne sojeve limfocita koji su izmaknuli mehanizmima kontrole i doveli do razvoja autoimunosne bolesti (48-50). Osim povećanja količine produkata apoptoze, moglo bi se raditi i o kvalitativnim promjenama u procesu apoptoze ili o poremećenom uklanjanju njezinih produkata (46). Sažeto, pojačano izlaganje produkata apoptoze imunosnom sustavu, kao rezultat procesa ili pokušaja kontrole osnovnoga autoimunosnog mehanizma, dovodi do predočavanja tih produkata (koji normalno nisu prisutni u krvotoku u tolikoj količini) stanicama specifične imunosti, što rezultira proizvodnjom protutijela usmjerenih na te produkte, to jest ANA. Opisani mehanizam stvaranja ANA mogao bi objasniti manjak osjetljivosti i specifičnosti većine ANA za pojedinu bolest, nepostojanje njihove povezanosti s pojedinim karakteristikama ili težinom kliničke slike pojedine bolesti te njihovu učestalu prisutnost u autoimunosnim bolestima kao što je multipla skleroza (51-53) kod koje zasigurno ne sudjeluju u patogenetskom mehanizmu. Konačno, budući da se apoptoza u određenoj mjeri događa i u zdravom organizmu, opisana teorija objašnjava i njihovu povremenu detekciju prilikom rutinskog testiranja pojedinaca koji su zdravi ili koji imaju naoko nevezane zdravstvene probleme (54).

1.3. Uloga ANA u dijagnostici bolesti

1.3.1. Sistemski eritemski lupus

Ova bolest prototip je stanja koje se vezuje uz ANA. Uostalom, ta su protutijela prvotno otkrivena u pokušajima uspostave laboratorijskih testova koji bi pridonijeli dijagnostičkom procesu kod ove bolesti. Neposredno prije njihova otkrića posumnjalo se na uključenost imunosnog odgovora u patogenezu bolesti na temelju otkrića stanica LE, to jest nukleofagocitoze (10). Vjerojatan razlog zbog kojeg su ANA otkrivena baš pri istraživanju SLE i zbog kojeg se tradicionalno vezuju uz ovu bolest jest činjenica da se u ovoj bolesti zamjećuje najveća specifičnost pojedinih protutijela. Ponajprije se tu misli na protutijela usmjerena na dvostruku uzvojnicu DNA (protutijela anti-dsDNA). Za razliku od protutijela usmjerenih na jednostruku uzvojnicu DNA (anti-ssDNA, prema engl. *single stranded DNA*) koja reagiraju s denaturiranom molekulom DNA, što ih čini mnogo manje specifičnim i podobnim za dijagnostiku i praćenje SLE (55), protutijela anti-dsDNA pokazuju visoku osjetljivost (79 %) i specifičnost (73 %) za dijagnozu SLE (56). Njihova specifičnost čini ih odličnim kriterijem za razlikovanje SLE od ostalih autoimunosnih reumatskih bolesti u kojima se ona vrlo rijetko pojavljuju (57,58). S obzirom na to da se njihov titar mijenja sukladno kliničkoj aktivnosti bolesti, titar u kombinaciji s kliničkim pokazateljima može poslužiti za praćenje remisije i relapsa SLE te u odluci o primjeni farmakoterapije (38,59). Smatra se da su protutijela anti-dsDNA direktno uključena u patogenezu lupusnog nefritisa, s obzirom na to da njihov titar korelira s pojavom nefritisa, a da su u glomerularnim membranama bolesnika s ovom komplikacijom dokazani depoziti imunokompleksa koji sadržavaju protutijela anti-dsDNA (60,61). Osim protutijela anti-dsDNA, s dijagnozom SLE povezuju se još neka protutijela koja se ubrajaju u skupinu ENA. ENA (vidi 6. stranicu) je povijesni naziv koji je proistekao iz prvotne metode ekstrakcije koja se koristila u njihovu dokazivanju (62). Ta su protutijela anti-Sm (nazvana prema pacijentici Stephanie Smith kod koje su prvi put izolirana)(63) te anti-U1-RNP (prema engl. *U1-ribonucleoprotein*). Antigeni na koja se stvaraju oba ova protutijela nalaze se zajedno s antigenima U2-U6 u jezgrenim česticama koje se nazivaju snRNP (prema engl. *small nuclear ribonuclein particles*), a protutijela na njih učestalo su istodobno pozitivna u bolesnika sa SLE (64,65). Protutijela anti-Sm manje su osjetljiva za dijagnozu SLE jer su prisutna u manje od polovine bolesnika, ali su zato visoko specifična. Dodatna im je osobitost da se njihov titar ne mijenja ovisno o aktivnosti bolesti. Prisutna su i u stadijima mirovanja bolesti kada protutijela anti-dsDNA

mogu privremeno iščeznuti, što ih čini dodatno dijagnostički korisnima (66,67). Nasuprot tomu, protutijela anti-U1 RNP nisu toliko specifična jer se redovito nalaze i u bolesnika s miješanom bolešću vezivnog tkiva (MCTD, prema engl. *mixed connective tissue disease*), a povremeno u ostalim autoimunosnim reumatskim bolestima u nižim titrovima (2). Nadalje, protutijela koja su visoko specifična za SLE jesu anti-ribosomska P-protutijela, a prisutna su u manjem udjelu bolesnika s ovom bolešću (68). Postoje indicije da bi se ta protutijela mogla u većem postotku naći u bolesnika s neuropsihijatrijskim očitovanjem SLE (69,70), kao i u bolesnika sa zahvaćenom jetrom (71) ili bubregom (72). No, eventualna povezanost još je nedovoljno istražena. Specifičan je entitet lupus uzrokovan lijekovima koji se može razviti kod primjene mnogih lijekova, najčešće prokainamida i hidralazina, a rjeđe, ali klinički bitno, kod liječenja inhibitorima TNF-α (prema engl. *tumor necrosis factor alpha*) (73). Osobitost pri dijagnostici ove bolesti visoka je učestalost ANA usmjerenih na histone (74). Ta se protutijela mogu javiti i u idiopatskog SLE, ali su u tom slučaju najčešće pristutna i neka od ranije navedenih protutijela, što nije čest slučaj kod lupusa uzrokovanog lijekovima kod kojeg su protutijela najčešće samo prolazno prisutna (75).

Važnost ANA u dijagnostici SLE očituje se i u činjenici da su ona ulazni kriterij u najnovijim dijagnostičkim kriterijima bolesti koje su definirala vodeća međunarodna društva. Drugim riječima, bez dokaza prisutnosti ANA u trenutku postavljanja sumnje na dijagnozu ili nekad ranije tijekom života nije moguća dijagnoza SLE. Protutijela moraju biti prisutna u titru većem ili jednakom od 1 : 80, dokazana s pomoću IIF na HEp-2 stanicama ili ekvivalentno vrijednom metodom (76).

1.3.2. Sjögrenov sindrom

Protutijela iz skupine ANA koja se tradicionalno najviše vezuju uz ovu bolest jesu anti-SS-A (poznata još kao anti-Ro) i anti-SS-B (poznata još kao anti-La). Protutijela anti-SS-A reagiraju s jednim od dva antigena Ro52 i Ro60. Prvi, nazvan po svojoj molekularnoj masi od 52 kDa, koristi se i naziv TRIM21, vjerojatno sudjeluje u regulaciji upalnih procesa, a nalazi se u citoplazmi (77,78). Za razliku od njega, Ro60 (nazvan još i TROVE2) nalazi se u jezgri, a vjeruje se da regulacijom transkripcije i stabilnosti mRNA (prema engl. *messenger ribonucleic acid*) ima ulogu u funkciji te molekule (79,80). Dokazano je da miševi u kojih stanice ne proizvode bilo koju od ovih molekula razvijaju autoimunosnu bolest (81,82).

Protutijela anti-SS-B reagiraju s antigenom La koji se obično nalazi u jezgri (83), a migrira između jezgre i citoplazme te je vjerojatno važan u regulaciji funkcije mRNA (84).

Protutijela anti-SS-A nalaze se u oko 60 % bolesnika sa Sjögrenovim sindromom, ali također i u nizu drugih autoimunosnih bolesti, ponajprije u SLE (85). Za razliku od njih, protutijela anti-SS-B specifičnija su za Sjögrenov sindrom i SLE (86). Kod većine bolesnika sa Sjögrenovim sindromom istodobno su prisutna oba spomenuta protutijela (87). Bolesnici koji imaju protutijela usmjerena na TRIM21 imaju težu kliničku sliku (88). Osim kod Sjögrenovog sindroma, oba protutijela klinički su bitna jer se učestalo nalaze u majki novorođenčadi s neonatalnim lupusom (89). Protutijela anti-SSA također su odgovorna za barem polovinu bolesnika sa SLE u kojeg su probirom ANA klasificirana kao negativna zbog pokatkad otežane detekcije tih protutijela IIF metodom (90).

Osim navedenih protutijela, mali udio bolesnika sa Sjögrenovim sindromom može imati pozitivna protutijela usmjerena na centromere. Ovi bolesnici mogu imati kliničke simptome koji se preklapaju sa sistemskom sklerozom, ali nedovoljno izražene da bi se mogla postaviti dijagnoza i te bolesti (91).

Prema nedavnim kriterijima za postavljanje dijagnoze Sjögrenovog sindroma koji su razvijeni suradnjom dvaju najistaknutijih međunarodnih društava koja se bave autoimunosnim reumatskim bolestima, protutijela anti-SS-A zauzimaju važno mjesto te je njihova prisutnost (kao jedini laboratorijski kriterij) ujedno i jedan od pet kriterija za klasifikaciju bolesti (92).

1.3.3. Sistemska skleroza

U ovoj bolesti ANA su pozitivna u 95 % bolesnika (93). Najčešće se radi o jednom od triju protutijela, od kojih je jedno usmjereno na centromere, drugo na topoizomerazu 1, a treće na RNA-polimerazu III. Prva, anti-centromerna protutijela, usmjerena na protein centromere B, (CENP-B, prema engl. *centromere protein B*) povezana su uglavnom s ograničenim kožnim oblikom bolesti (94). Protutijela usmjerena na DNA topoizomerazu 1 (antigen Scl-70) povezuju se s difuznim kožnim oblikom bolesti i s učestalim zahvaćanjem plućnog intersticija (95). Bolesnici koji imaju protutijela usmjerena na RNA-polimerazu III najčešće imaju difuzni kožni oblik bolesti koji se u njihovu slučaju očituje opsežnim brzoprogresivnim zahvaćanjem kože (96). Nadalje, u ovih se bolesnika može javiti i bubrežno zatajenje

(renalna kriza skleroderme) (97). Sva su navedena protutijela visoko specifična za sistemsku sklerozu, ali im je osjetljivost niska (98,99). Također je bitno naglasiti da su ta protutijela najčešće međusobno isključujuća (100).

Prisutnost jednog od navedenih protutijela nalazi se u klasifikacijskim kriterijima ove bolesti donesenim konsenzusom istih društava kao i u slučaju Sjögrenova sindroma, ali za razliku od Sjögrenova sindroma, kod kojeg je važnost prisutnosti specifičnih protutijela kod bodovanja velika, u sistemskoj sklerozi prisutnost ranije opisanih protutijela nije ključna za postavljanje dijagnoze (101).

1.3.4. Miješana bolest vezivnog tkiva

U samoj definiciji miješane bolesti vezivnog tkiva (MCTD, prema engl. *mixed connective tissue disease*) nalazi se jedno specifično protutijelo iz skupine ANA, protutijelo anti-U1-RNP. Prema toj definiciji, riječ je o bolesti s nekim karakteristikama drugih bolesti vezivnog tkiva (SLE, sistemska skleroza, polimiozitis) kod koje se nalazi protutijelo anti-U1-RNP (102). U početku razvoja MCTD vrlo su rijetko prisutni simptomi svih gore navedenih bolesti te se najčešće početno razmatraju dijagnoze neke od bolesti iz tog spektra na koju simptomi u tom trenutku upozoravaju. Međutim, prisutnost protutijela anti-U1-RNP u visokom titru snažno je povezana s kasnijim razvojem punog spektra simptoma te dijagnozom MCTD (103).

S obzirom na to da se, kao što je ranije spomenuto, protutijelo anti-U1-RNP može pojaviti i u bolesnika sa SLE (2), a neka su istraživanja pokazala da znatan udio bolesnika s MCTD ispunjava i dijagnostičke kriterije za SLE (104), postavlja se pitanje kako definitivno razlikovati bolesnike s ovom bolešću od SLE. Osim visokog titra U1-RNP protutijela, u postavljanju dijagnoze mogu pomoći i detaljnije studije specifičnosti protutijela. Naime, molekula U1-RNP sastoji se od RNA i tri bjelančevine, A'-bjelančevine, C-bjelančevine i bjelančevine veličine 68-70 kDa. Klinička slika MCTD najčešće je povezana s protutijelima koji reagiraju s dvjema od navedenih bjelančevina – A'-bjelančevinom i bjelančevinom veličine 68 – 70 kDa (105,106).

1.3.5. Dermatomiozitis i polimiozitis

Dijagnoza polimiozitisa bez zahvaćanja ili sa zahvaćanjem kože vezuje se s mnogim specifičnim autoprotutijelima. Najpoznatije od njih je protutijeo anti-Jo-1 koje je najčešće detektirano protutijelo iz skupine anti-sintetaznih protutijela. Ta su protutijela usmjerena na histidil-tRNA-sintetazu, enzim koji je bitan u procesu sinteze proteina temeljenoj na tRNA. Protutijela iz skupine anti-sintetaznih protutijela udružena su s nekoliko karakterističnih kliničkih očitovanja, uz miozitis to su intersticijska bolest pluća i artritis (107). Protutijelo anti-Jo-1 nalazi se u oko 20 % idiopatskih upalnih miopatija (108). Bolesnici u kojih se u obradi zbog suspektne autoimunosne bolesti nađe ovo protutijelo imaju u do 94 % slučajeva dokaze miozitisa (109). Osim protutijela anti-Jo-1, nekoliko se drugih protutijela profiliralo kao učestali biljezi upalnih bolesti mišića. Jedno od tih protutijela usmjereno je na česticu koja prepoznaje signale (anti-SRP, prema engl. *signal recognition particle*) i visoko je specifično za miozitis, a osobito za njegovu inačicu u kojoj se histološki pronalazi nekroza mišićnih vlakana (110). Također se izdvajaju i protutijela anti-Mi-2, usmjerena na enzim helikazu koja je uključena u transkripciju bjelančevina. Ona se povezuju s akutnom formom dermatomiozitisa koja dobro reagira na terapiju (108). Definirana su i brojna druga protutijela koja se mogu pojaviti u bolesnika s upalnim miopatijama (111). U slučajevima kada se u bolesnika s miozitisom pronađu neka od protutijela koja su udružena s ranije opisivanim reumatskim autoimunosnim bolestima, obično se radi o sindromu preklapanja s tim bolestima (112).

1.3.6. Druge autoimunosne bolesti

Što se tiče bolesti pretpostavljene autoimunosne geneze u kojih postoji veća prevalencija ANA pozitivnosti, a koje ne spadaju među bolesti reumatskog spektra, valja izdvojiti multiplu sklerozu (MS). U toj se bolesti već nekoliko desetaka godina opisuju ANA čija se učestalost, ovisno o metodologiji testiranja, kreće od 2 do čak 80 % (51-53). S obzirom na to da se prisutnost tih protutijela u ovom slučaju nije mogla objasniti uvriježenim konsenzusom o njihovoj indukciji, njihova je prisutnost proglašavana lažno pozitivnim rezultatom (51). Pojedini stručnjaci smatraju da testiranje na prisutnost ANA treba izbaciti iz rutinske diferencijalnodijagnostičke obrade bolesnika s MS s obzirom na činjenicu da ih se na ovaj način ne može razlikovati od bolesnika s neurološkim manifestacijama reumatskih bolesti

(113,114). Novija istraživanja upućuju na vezu prisutnosti ANA i apoptoze na periferiji bolesnika s MS (115). U autoimunosnim bolestima štitnjače također je dokazana prisutnost ANA u visokim proporcijama i u djece (116) i odraslih (117). U slučaju upalnih bolesti crijeva prisutnost ANA vezuje se s razinama vitamina D (118). Njihova je učestalost u odnosu na zdravu populaciju veća u bolesnika s ulceroznim kolitisom i u bolesnika s Crohnovom bolešću, kao i među članovima njihove rodbine (119). U slučaju ulceroznog kolitisa ta su protutijela povezana s ovisnosti o glukokortikoidima (120). ANA su prisutna u 50 do 70 % bolesnika s autoimunosnim hepatitisom tipa 1 (121,122) te su čak i dio dijagnostičkih kriterija za ovu bolest (123). Pojedina ANA specifična su i za primarni bilijarni kolangitis (PBC, prema engl. *primary billiary cholangiitis*) (124). U bolesnika s atopijskim dermatitisom ANA su također prisutna u velikom postotku, uz porast titra koje prati pogoršanje kliničke slike (125).

1.4. Pojavnost ANA u neimunosnim bolestima i u zdravih osoba

S obzirom na činjenicu da su ANA u najvećem postotku prisutna u osoba s autoimunosnim reumatskim bolestima, njihova je važnost ponajviše istraživana u tim situacijama s kojima su neraskidivo vezani. Međutim, s porastom broja populacijskih istraživanja spoznalo se da su ANA pozitivna kako u nekih drugih bolesti i stanja, tako i u zdravih osoba. U slučaju potonjih, postotak pozitivnih u nekim se populacijskim studijama kretao (ovisno o razrjeđenju uzoraka) između 2 i 30 % (54,126,127). Na rezultate, čini se, utječu i razlike u spolu i rasi (128,129). Proporcija zdravih osoba s pozitivnim testom IIF na ANA logično pada s razinom razrjeđenja testiranih seruma (13,8 % pri razrjeđenju 1 : 40; 4,3 % pri razrjeđenju od 1 : 80; 3,7 % pri razrjeđenju od 1 : 320; 1,1 % pri razrjeđenju od 1 : 1000) (126,127). U zdrave djece znatni se postoci pozitivnih nalaze pri razrjeđenju od 1 : 40, dok se pri standardnom razrjeđenju od 1 : 80 ANA pronalaze u oko 3 % osoba (130). Razlozi koji bi objasnili prisutnost ANA u zdravih osoba nisu još u potpunosti poznati. Teorije govore o mogućim stanjima koje prethode manifestnoj autoimunosti, o manjkavostima testova kojima se ta pozitivnost utvrđuje (54,131) ili o ranije objašnjenim uzrocima povezanim s razinama i osobitostima apoptotskih procesa (46). Određeni postotak ANA-pozitivnosti u zdravih osoba može se odnositi na protutijela anti-DFS70/LEDGF (prema engl. *dense fine speckled/ lens epithelium-derived growth factor*). Za protutijela anti-DFS70/LEDGF smatra se da bi mogla poslužiti i kao biljeg odsutnosti autoimunosne bolesti budući da je njihova prisutnost

učestalija u zdravih nego u osoba koje boluju od tih bolesti (132). Različita upalna stanja u organizmu također mogu potaknuti stvaranje protutijela anti-DFS70/LEDGF (133). Od infektivnih stanja koja se povezuju s povišenom učestalošću ANA-pozitivnosti izdvajaju se infekcije unutarstaničnim uzročnicima, među kojima su *M. tuberculosis*, *T. pallidum* i virus ljudske imunodeficijencije (HIV, prema engl. *human immunodeficiency virus*) (134). Učestala prisutnost ANA evidentirana je i u velikom broju raznovrsnih malignih oboljenja (135) gdje se učestalo pronalaze probirom bez dokaza protutijela specifičnih za reumatske bolesti. Prisutnost ANA u nekim se tumorima povezuje s boljom prognozom, kao što je u slučaju karcinoma pluća ili melanoma (136,137). No, s druge strane njihova prisutnost može kliničare odvesti u pogrešnom dijagnostičkom smjeru i odgoditi postavljanje dijagnoze maligne bolesti, a samim time i liječenje (138). Ove spoznaje upozoravaju na potrebu unaprjeđenja razumijevanja etiologije ANA koja se, očigledno, ne smiju promatrati samo u uskom kontekstu reumatskih bolesti, nego na razini fiziološkog funkcioniranja imunosnog sustava i čimbenika koji dovode do njegova narušavanja.

1.5. Prednosti i mane metode zlatnog standarda za dijagnostiku ANA

Kao što je ranije navedeno, usprkos pronalasku raznovrsnih novih metoda, preporuke podrazumijevaju zadržavanje IIF na stanicama HEp-2 kao metode početnog probira, uz primjenu dodatnih metoda u svrhu određivanja specifičnosti protutijela u slučaju dokaza njihove prisutnosti IIF metodom (3). Upravo činjenica da se ovom metodom skoro bez iznimke otkrivaju sva protutijela koja su prisutna u serumu, a koja reagiraju s unutarstaničnim antigenima, najveća je komparativna prednost ove metode koja se ne može nadomjestiti niti jednom metodom koja podrazumijeva unaprijed zadanu i konačnu mješavinu antigena (139,140). Naime, uz pomoć IIF mogu se otkriti i protutijela nepoznate specifičnosti, što se jasno vidi iz činjenice da se u ANA-pozitivnim uzorcima utvrđenim metodom IIF specifična protutijela ne dokažu u svim slučajevima (141). Ostatak ANA-pozitivnih seruma najvjerojatnije sadržava protutijela koja nisu prisutna u zadanim panelima (142,143) ili su čak u potpunosti nepoznata, što dovodi do smanjenja specifičnosti ovog testa u dijagnostici klinički relevantne autoimunosne bolesti (144). Iznimka od gore navedenih tvrdnji prva je mana metode IIF koja u slučaju neopreza može dovesti do pogrešnog rezultata koji ne upućuje na autoimunosnu bolest. Naime, u određenim se slučajevima zbog prirode postupka pripreme pločica koje se analiziraju pod fluorescencijskim mikroskopom može dogoditi da iz

podloge, za koju bi se inače vezala serumska protutijela, difundiraju antigeni SS-A (145) koji su u toj podlozi i inače slabo zastupljeni (146). Zbog toga se anti-SS-A protutijela ne mogu vezati za svoje antigene u podlozi pa uzorak ne pokazuje tipičnu fluorescenciju i proglašava se negativnim na prisutnost ANA (147). Spoznaja o mogućnosti ove pojave vrlo je bitna pri dijagnosticiranju prirođenoga srčanog bloka u novorođenčadi s neonatalnim lupusom (148). Slična situacija može se dogoditi s protutijelima anti-Jo-1 u kontekstu dermatomiozitisa ili polimiozitisa (149). Sve te pojave pokazuju da se i najveća prednost ove metode mora uzimati s rezervom te da je svaki ispitivani uzorak potrebno promatrati u kontekstu kliničke slike te prema potrebi, usprkos negativnom rezultatu, proširiti obradu testiranjem na specifična protutijela. S druge strane, izostavljanjem IIF-testa i korištenjem samo nekog od testova za specifična protutijela bio bi izostavljen velik broj slučajeva u kojima su ANA uistinu prisutna. Sukladno tome, preporuke govore da se niti jedan takav test s ograničenim brojem staničnih antigena ne može u rutinskom radu nazivati ANA-testom ili ANA-probirnim testom jer bi se u protivnom moglo kliničare dovesti u zabludu da je njime u potpunosti isključena prisutnost ANA (3). IIF-metoda nije pretjerano skupa sa stajališta potrebnih materijala (uz pretpostavku da laboratorij posjeduje fluorescencijski mikroskop), ali je vrlo zahtjevna iz perspektive utrošenog vremena i rada laboratorijskog osoblja, što dovodi do ograničenog broja testiranih seruma u jedinici vremena.

Konačno, ova je metoda notorno osjetljiva na manjak iskustva te kliničkoga i laboratorijskog znanja osobe koja analizira uzorke, što čini nužnim postojanje visoko educiranih eksperata da bi se postigla maksimalna pouzdanost dobivenih rezultata i uporabna vrijednost metode (56,150). Isto tako je ova činjenica čini nepraktičnom u sredinama s malim brojem testiranih uzoraka jer ne opravdava zapošljavanje odgovarajućeg stručnjaka, a dramatično gubi na vrijednosti u slučaju njegova nepostojanja. Niti u slučaju postojanja odgovarajućeg osoblja ne može se u potpunosti osigurati uniformnost rezultata jer se pokazalo da i među stručnjacima može doći do subjektivnih razlika koje se više odnose na prepoznavanje pojedinih obrazaca IIF nego na proglašavanje uzoraka ANA pozitivnim ili negativnim (151). Osobitosti ovog testa pokazuju da ga je, koliko god bio u trenutačnom stanju razvoja tehnologije i spoznaja nezamjenjiv i neizostavan, potrebno koristiti s dozom kritičnosti, imajući na umu njegova ograničenja i uvijek uzimajući u obzir osobitosti kliničke slike testiranog ispitanika.

1.6. Obrasci imunofluorescencije

1.6.1. Konsenzus ICAP

Unatoč ranijim pokušajima standardizacije izvođenja dijagnostike ANA i izvještavanja o rezultatima proizašlim iz tih postupaka (152) i dalje je postojala potreba uvođenja jedinstvenih kriterija za označavanje obrazaca IIF koji se mogu uočiti na stanicama HEp-2.

Tijekom 12. kongresa IWAA (prema engl. *International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity*), koji je održan 2014. u Brazilu, na temeljima ranijeg brazilskog konsenzusa iz 2000. godine, donesen je međunarodni konsenzus o obrascima indirektne imunofluorescencije ANA (ICAP, prema engl. *International Consensus on ANA Patterns*). Prva verzija preporuka koje su nosile oznaku ICAP temelje se većinom na zaključcima s tog kongresa (153). Preporuke su objavljene 2015. godine uz formiranje *web*-stranice na kojoj je dostupna klasifikacija i nomenklatura proizašla iz tih preporuka (154).

Prema istoj klasifikaciji, sveukupno 29 zasebnih obrazaca IIF podijeljeno je u tri glavne skupine: jezgreni obrasci, citoplazmatski obrasci i mitotski obrasci. Ovim obrascima dodijeljeni su kodovi AC (prema engl. *anti-cell*)-1 do AC-29, uz dodatan kod AC-0 za uzorke koji su ovom metodom negativni. Ovaj klasifikacijski sustav prikazan je u Tablici 1.

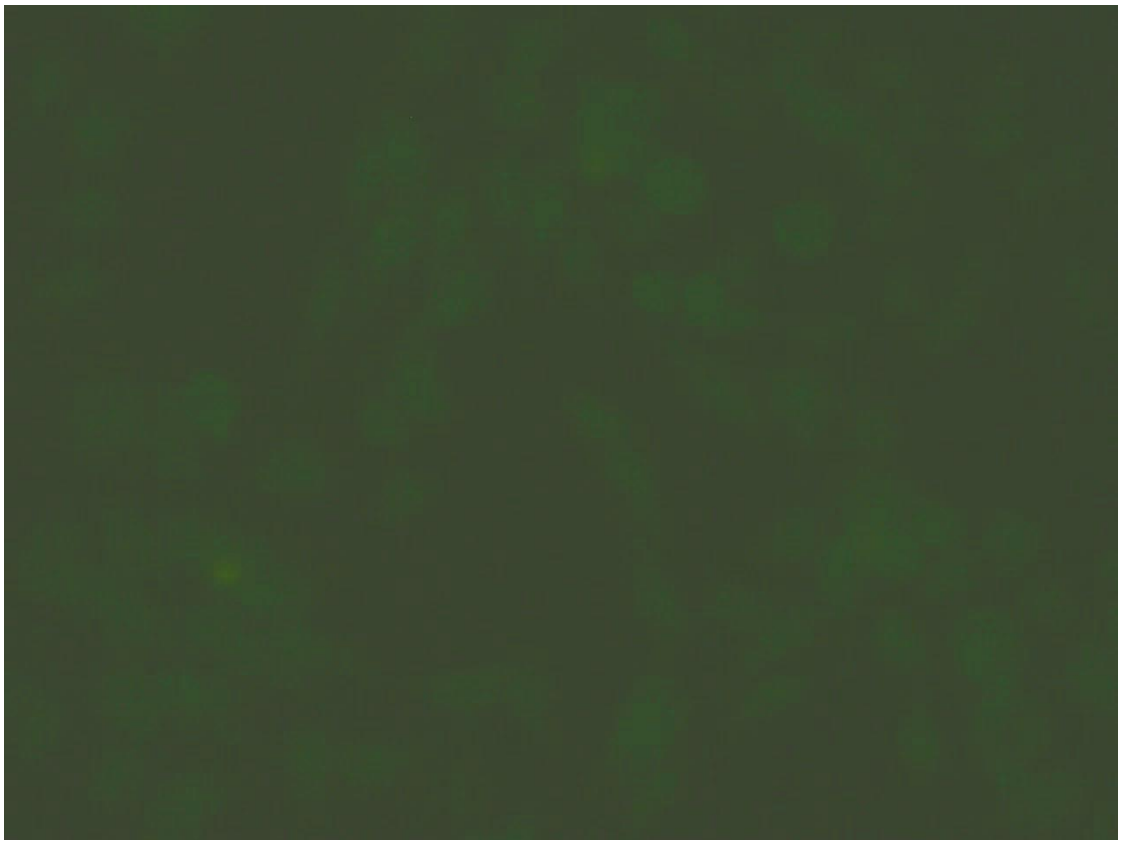
Tablica 1. Sustav označavanja imunofluorescencijskih obrazaca na HEp-2 stanicama u dijagnostici ANA (prilagođeno prema 154)

Kategorija	Prva podjela	Druga podjela	AC oznaka
negativni			**AC-0**
jezgreni	homogeni		**AC-1**
	točkasti	gusti fino granulirani	**AC-2**
		fino točkasti	**AC-4**
		grubo točkasti	**AC-5**
		tip Topo I	**AC-29**
	centromere		**AC-3**
	pojedine jezgrene točke	mnogostruke	**AC-6**
		nekoliko	**AC-7**
	nukleolarni	homogeni	**AC-8**
		grudasti	**AC-9**
		točkasti	**AC-10**
	jezgrena ovojnica	glatka	**AC-11**
		točkasta	**AC-12**
	pleomorfni	tip PCNA (jezgreni antigen proliferirajućih stanica, prema engl. *proliferating cell nuclear antigen*)	**AC-13**
		CENP-F (bjelančevina centromere F, prema engl. *centromere protein F*)	**AC-14**
citoplazmatski	fibrilarni	linearni	**AC-15**
		nitasti	**AC-16**
		segmentirani	**AC-17**
	točkasti	pojedine točke	**AC-18**
		gusti fino granulirani	**AC-19**
		fino točkasti	**AC-20**
	AMHA (antimitohondrijska protutijela)		**AC-21**
	Golgi		**AC-22**
	štapići i prstenovi		**AC-23**
mitotski	centrosomi		**AC-24**
	diobeno vreteno		**AC-25**
		tip NuMA (jezgreni mitotski sklop, prema engl. *nuclear mitotic apparatus*)	**AC-26**
	međustanični most		**AC-27**
	mitotski kromosomski		**AC-28**

1.6.2. Obrasci fluorescencije i njihova važnost

Postoji nekoliko obrazaca IIF koji se pojavljuju u velikom postotku slučajeva i koji su dobro povezani s pojedinim kliničkim stanjima i sa specifičnim protutijelima (3). Velik broj obrazaca IIF još se uvijek istražuje, a do sada poznate određene činjenice (154) bit će obrađene u ovom poglavlju. Svakom je obrascu IIF pridružena vlastita slika snimljena u laboratoriju gdje je studija izrađena.

Negativan nalaz IIF-testa ne definira se apsolutnim izostankom bilo kakvoga vidljivog signala pod fluorescencijskim mikroskopom zato što to ovisi i o nizu drugih faktora – prilagodba svjetline, ostatna fluorescencija i drugo. Negativan se nalaz definira izostankom bilo kojeg od jasno razlučivih specifičnih obrazaca IIF pri danom razrjeđenju (155) (Slika 1.).

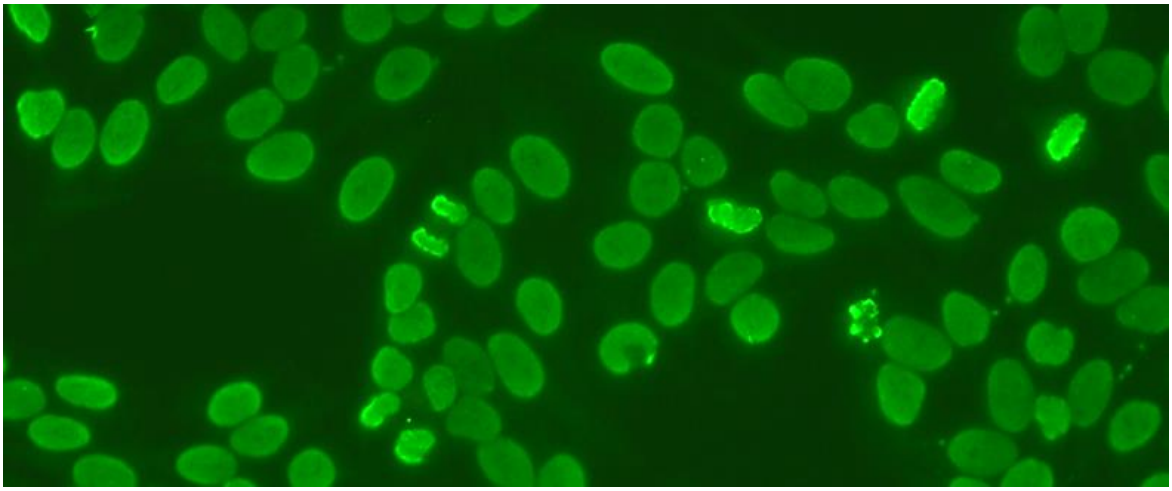


Slika 1. Negativna ANA metodom indirektne imunofluorescencije na stanicama HEp-2.

1.6.2.1. Jezgreni obrasci IIF

Homogeni (AC-1)

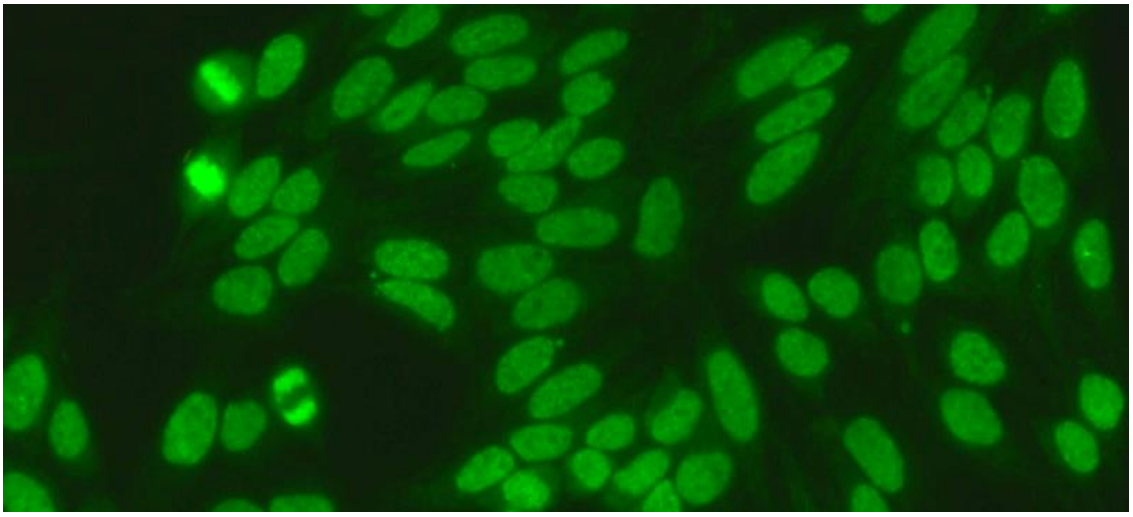
U ovom obrascu fluorescencija je ravnomjerno raspodijeljena po cijeloj nukleoplazmi, uz moguće bojenje nukleola (ovisno o staničnom supstratu) (Slika 2). Antigeni uz koje je ovaj obrazac povezan su dsDNA, nukleosomi i histoni. Sukladno tome, najčešće se povezuje uz SLE, bolest koja je povezana ponajprije uz protutijela usmjerena na dsDNA, ali i na druge antigene, poput histona (56). Ovaj obrazac IIF može se sresti i u bolesnika s autoimunosnim hepatitisom (156), kao i u sklopu kompozitnog obrasca AC-29 koji se vezuje uz protutijela usmjerena na topoizomerazu I u sklopu sistemske skleroze (157).



Slika 2. Obrazac fluorescencije AC-1 na stanicama HEp-2.

Gusti fino granulirani (AC-2)

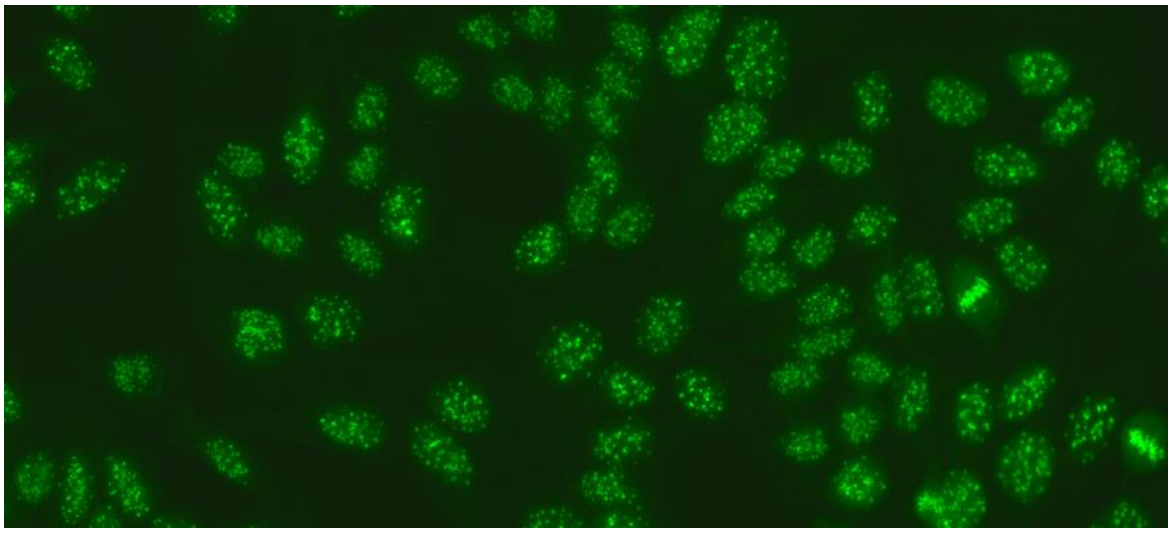
Osnovno je obilježje ovog obrasca IIF heterogena raspodjela točkica unutar jezgre koje sačinjavaju pojedina gušća i rjeđa područja fluorescencije. Metafazna ploča pokazuje jak točkasti uzorak, uz isticanje pojedinih grubih točaka (Slika 3). Ovaj je obrazac povezan s protutijelom na DFS70/LEDGF koje je predloženo kao biljeg isključenja autoimunosne reumatske bolesti. Ova je teza temeljena na činjenici da se ova protutijela učestalo pojavljuju u bolesnika koji nemaju relevantnu autoimunosnu bolest (132). Međutim, navedeno za obrazac AC-2 vrijedi samo u slučaju da se potvrdi specifičnost protutijela na DFS70/LEDGF, bez čega ga nije moguće povezati s odsutnošću autoimunosnih reumatskih bolesti (158), što je naglašeno činjenicom da taj obrazac može biti povezan i s nekim drugim protutijelima (159).



Slika 3. Obrazac fluorescencije AC-2 na stanicama HEp-2.

Centromere (AC-3)

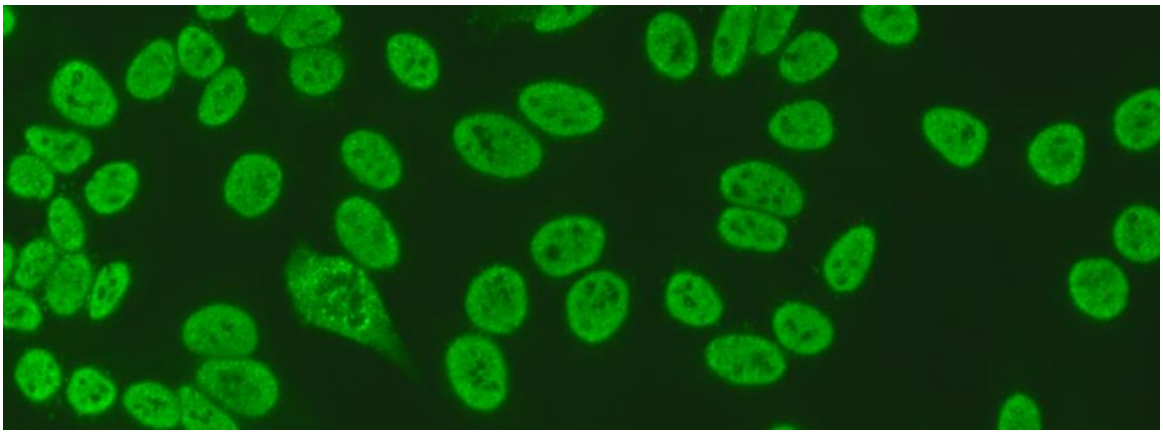
U ovom obrascu može se vidjeti 40 - 80 pojedinačnih grubih točaka raspršenih u interfaznim stanicama, dok se u mitotskim stanicama fluorescencija koncentrira na područje kromatina (Slika 4). Ranije se za ovaj obrazac upotrebljavao i naziv kinetohore. Vezan je za protutijela usmjerena na antigen CENP A/B, koja se nalaze u klasifikacijskim kriterijima za ograničeni kožni oblik sistemske skleroze (101). Ponekad se može vidjeti i u bolesnika s primarnim bilijarnim kolangitisom, ali oni često imaju istodobno i sistemsku sklerozu (160).



Slika 4. Obrazac fluorescencije AC-3 na stanicama HEp-2.

Fino točkasti (AC-4)

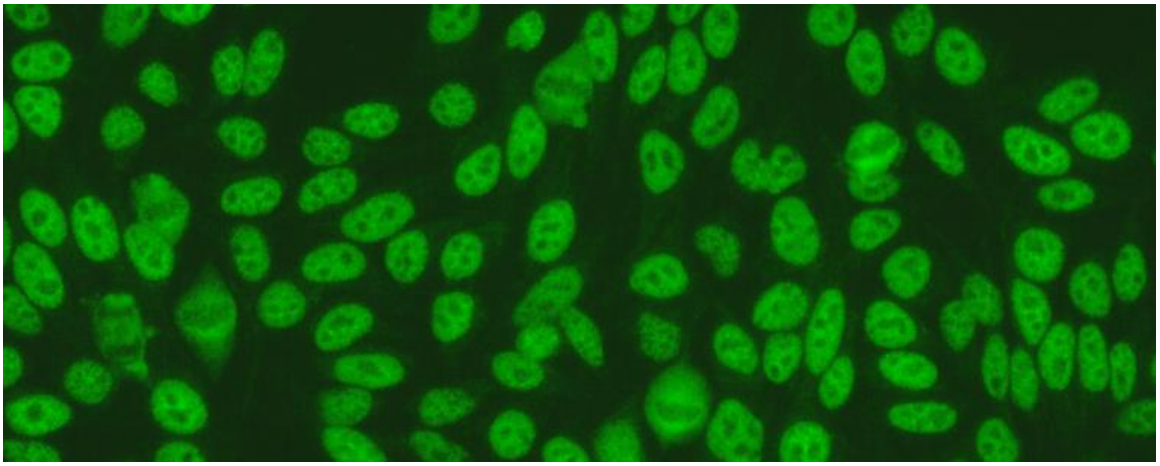
Za razliku od homogene fluorescencije nukleoplazme kod obrasca AC-1, kod obrasca AC-4 u njoj se izdvajaju sitne točkice (Slika 5). Taj se obrazac povezuje s protutijelima na učestale antigene SS-A/Ro i SS-B/La, kao i na još neke manje učestale antigene (Mi-2, TIF1γ, TIF1β i Ku). S obzirom na povezanost s tim antigenima, učestalo se pojavljuje u bolesnika sa Sjögrenovim sindromom, ali i u raznih oblika SLE (primjerice neonatalnog lupusa), nekih oblika sistemske skleroze te u dermatomiozitisa i polimiozitisa. Kao što je ranije spomenuto, protutijela usmjerena na SS-A kojiput se ne mogu otkriti ovom metodom (92,147,161,162).



Slika 5. Obrazac fluorescencije AC-4 na stanicama HEp-2.

Grubo točkasti (AC-5)

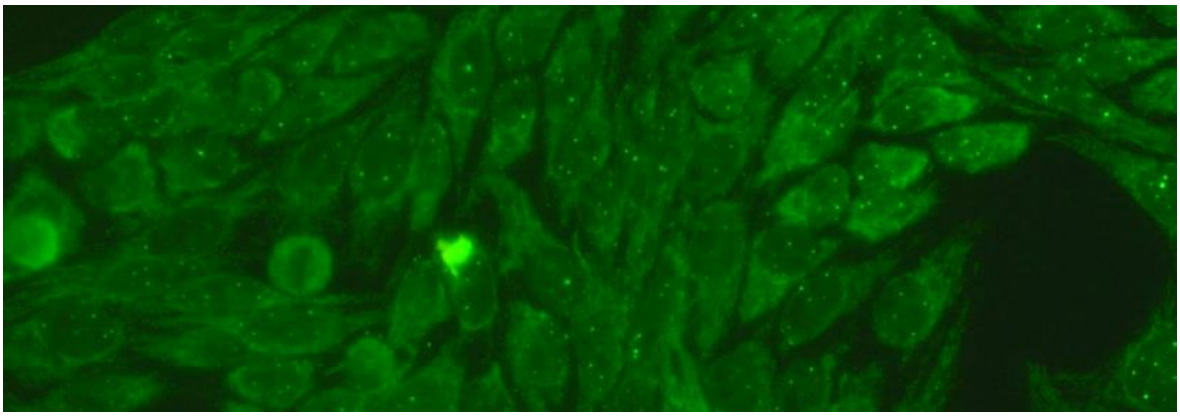
Ovaj se obrazac odlikuje grubim točkicama raspoređenim po jezgri, uz izostanak bojenja kromatina u mitotskim jezgrama (Slika 6). Povezuje se s protutijelima na hnRNP, U1-RNP, Sm i RNA polimerazu III. S obzirom na moguću prisutnost tih specifičnih protutijela, ovaj se obrazac može pojaviti u nekih bolesnka sa SLE ili sistemskom sklerozom, a učestalo se vidi u bolesnika s MCTD. U niskim titrovima povremeno se opaža i u zdravih osoba (163).



Slika 6. Obrazac fluorescencije AC-5 na stanicama HEp-2.

Pojedine jezgrene točke – mnogostruke (AC-6)

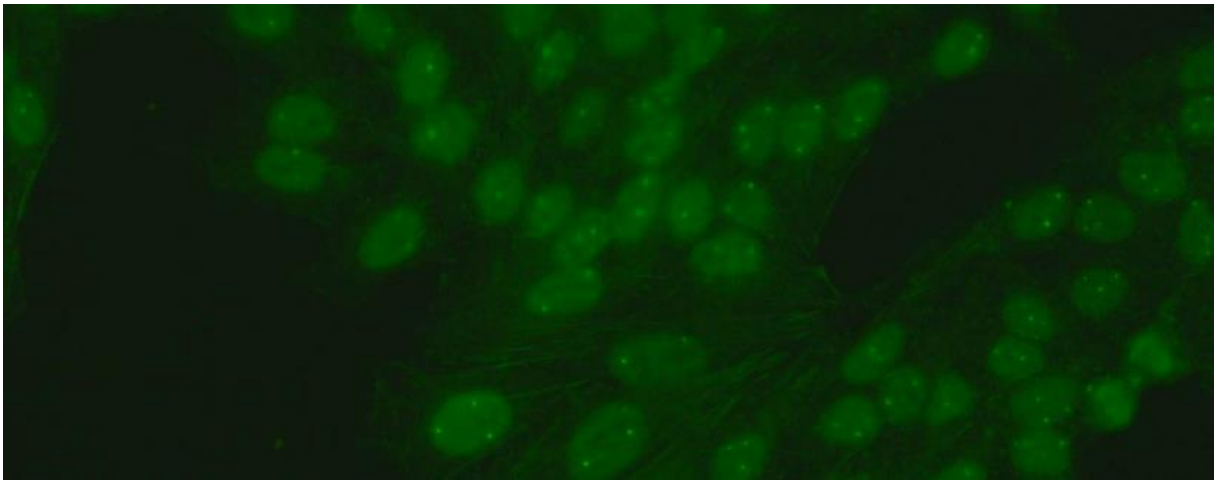
Kod ovog se obrasca u jezgri može izbrojiti 6 - 20 pojedinačnih točaka (Slika 7). Antigen uz koji se najčešće (ali ne isključivo) vezuje ovaj obrazac je Sp-100. Ovaj se obrazac može naći u mnogim autoimunosnim bolestima. U reumatskom spektru radi se o dermatomiozitisu/ polimiozitisu (kad je asociran s protutijelima anti-MJ/NXP-2), a inače se učestalo nalazi u bolesnika s primarnim bilijarnim kolangitisom (164,165).



Slika 7. Obrazac fluorescencije AC-6 na stanicama HEp-2.

Pojedine jezgrene točke – nekoliko (AC-7)

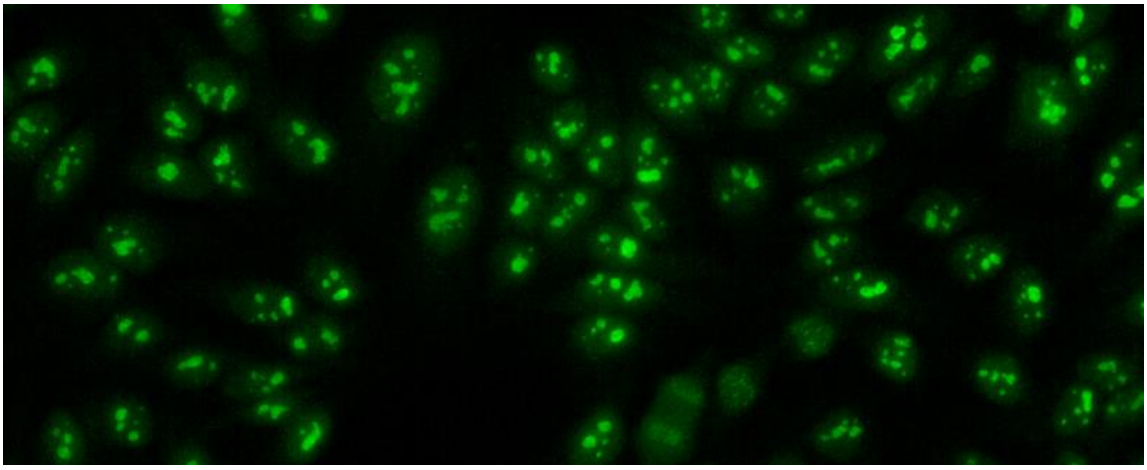
Kad se u jezgri može izbrojiti 1 - 6 zasebnih točaka, koje se nekad nazivaju i Cajalovim tjelešcima, radi se o obrascu AC-7 (Slika 8). Protutijela su u ovom obrascu usmjerena najčešće na p80-koilin, a nekad i na kompleks SMN (prema engl. *survival of motor neurons*). Ta protutijela, koliko se do sada zna, nisu izraženo povezana niti s jednim kliničkim entitetom, ali se mogu povremeno susresti u nekih ispitanika sa SLE, Sjögrenovim sindromom ili sistemskom sklerozom (166-168).



Slika 8. Obrazac fluorescencije AC-7 na stanicama HEp-2.

Nukleolarni homogeni (AC-8)

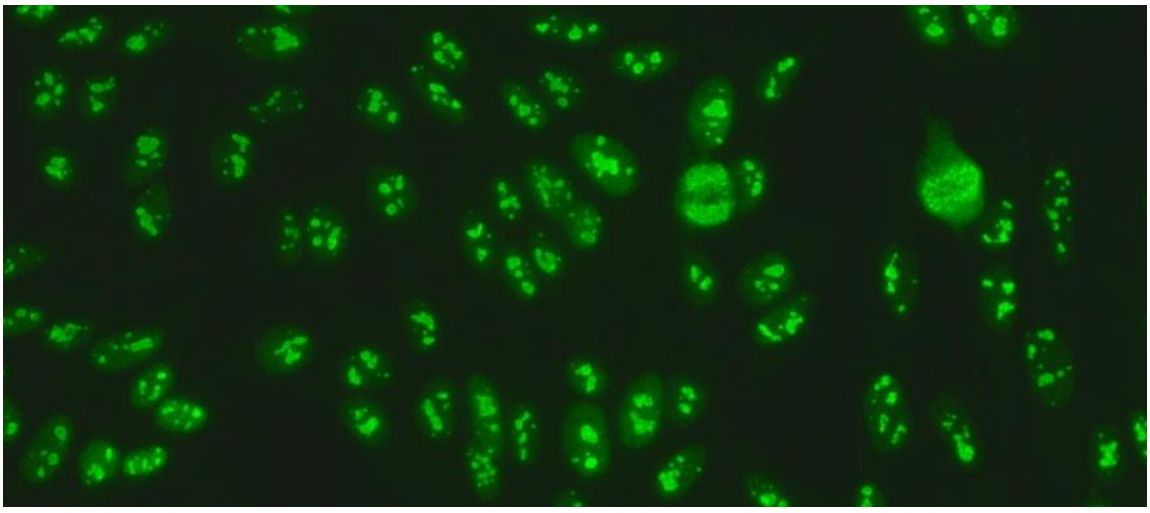
Ovaj obrazac označava difuzno homogeno bojenje cijelog nukleolusa, bez bojenja metafazne ploče (Slika 9). Povezuje se najčešće s protutijelima na antigene PM/Scl (PM/Scl-75, PM/Scl-100), a u nešto rjeđim slučajevima i Th/To, B23/nukleofozmin, nukleolin i No55/SC65. Klinička važnost protutijela na posljednja tri antigena nije poznata. Protutijela na ostale antigene najčešće se povezuju bilo sa sistemskom sklerozom, bilo sa sindromom preklapanja te bolesti s upalnim miopatijama (169,170).



Slika 9. Obrazac fluorescencije AC-8 na stanicama HEp-2.

Nukleolarni grudasti (AC-9)

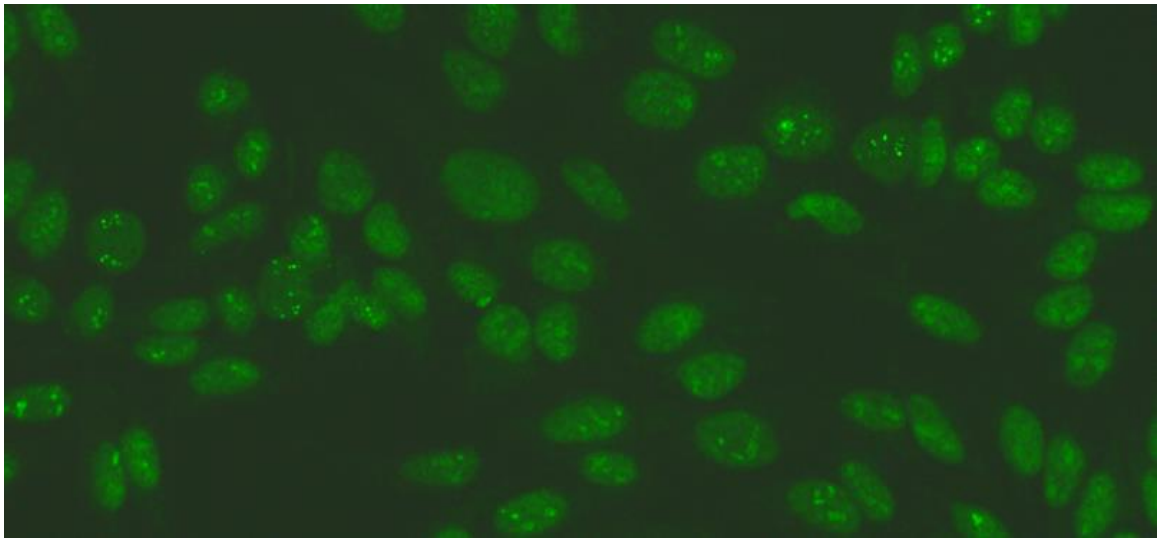
Za razliku od pravilnog bojenja kod obrasca AC-8, u ovom je obrascu bojenje nukleolusa nepravilno, a vidljivo je i perikromosomsko bojenje u metafaznim stanicama (Slika 10). Ovaj obrazac povezuje se uglavnom s protutijelima na U3-snoRNP/fibrilarin, što klinički odgovara difuznom obliku sistemske skleroze s učestalim zahvaćanjem kardiopulmonalnog sustava i poprečno-prugastih mišića (171,172).



Slika 10. Obrazac fluorescencije AC-9 na stanicama HEp-2.

Nukleolarni točkasti (AC-10)

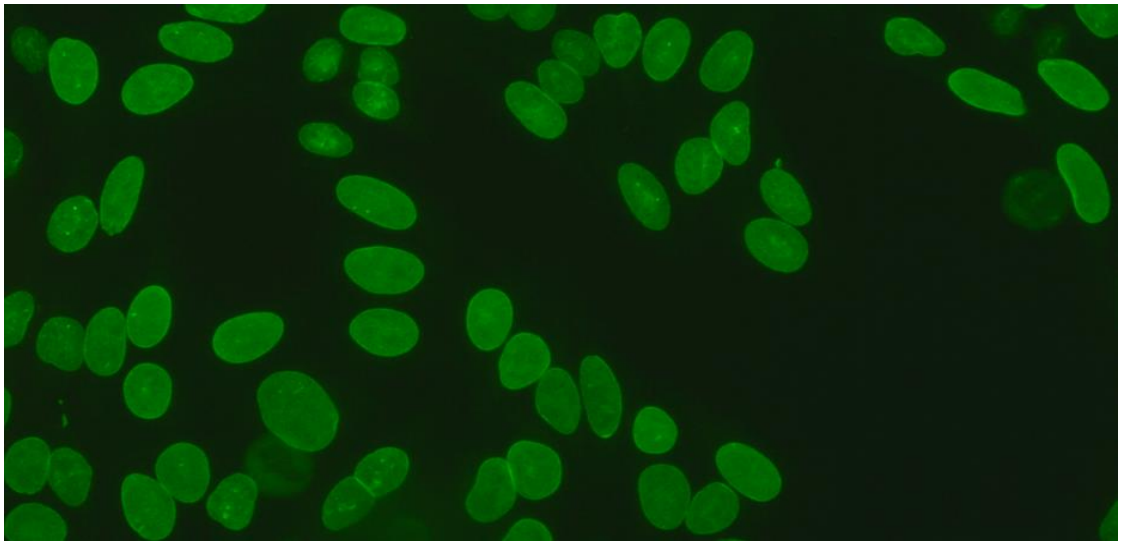
Kod ovog se obrasca u nukleolusu uočavaju zasebne točkice u interfazi, dok se u metafaznim stanicama može naći do pet parova točaka u kromatinu koje predstavljaju nukleolarnu organizacijsku regiju (NOR, prema engl. *nucleolar organizer region*) (Slika 11). Protutijela povezana s ovim obrascem IIF usmjerena su najčešće na RNA polimerazu I, a pojavljuju se u bolesnika sa sistemskom sklerozom, najčešće istodobno s protutijelima na RNA polimerazu III. Antigen koji alternativno može biti meta autoimunosne reakcije kod ovog je obrasca hUBF/NOR-90, također povremeno u bolesnika sa sistemskom sklerozom, ali i u nekih bolesnika s malignom bolešću i Sjögrenovim sindromom (173,174).



Slika 11. Obrazac fluorescencije AC-10 na stanicama HEp-2.

Jezgrena ovojnica - glatka (AC-11)

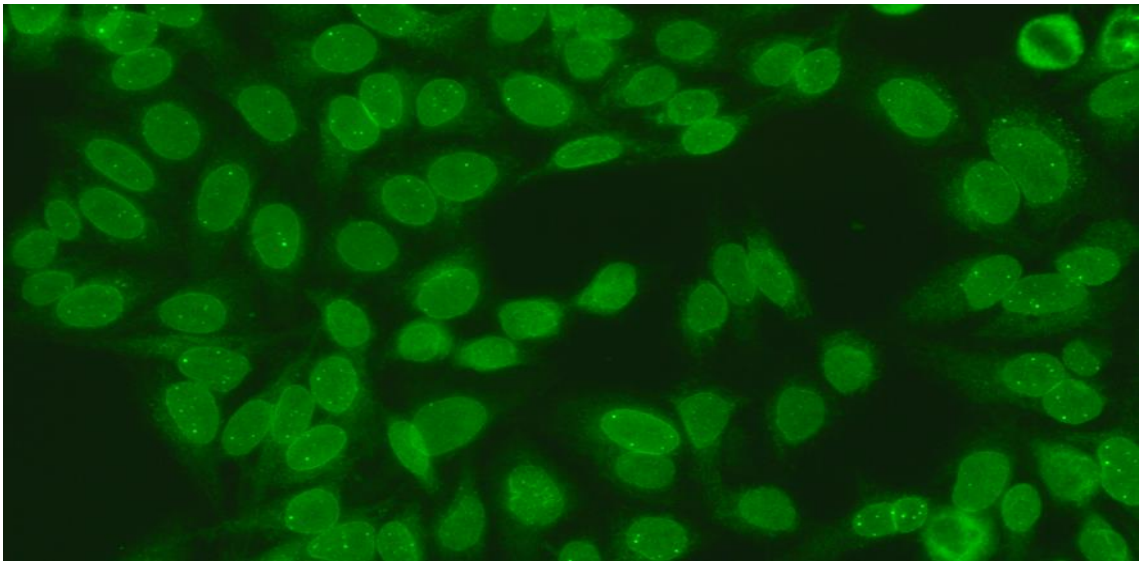
Signal fluorescencije jezgre kod ovog je obrasca homogen, ali ima izraženo pojačanje po rubu, uz specifično naglašenu fluorescenciju na dodirnim točkama dviju jezgara. Bojenja kromatina se ne nalaze (Slika 12). Taj je obrazac povezan s protutijelima na lamine (A, B ili C) te na proteine koji su s njima povezani. Ovaj rijetki obrazac IIF povremeno se viđa i u zdravih osoba, a pojedine manje studije povezivale su ga sa širokim spektrom autoimunosnih bolesti, od citopenija, jetrenih bolesti do reumatskih oboljenja i antifosfolipidnog sindroma (175,176).



Slika 12. Obrazac fluorescencije AC-11 na stanicama HEp-2.

Jezgrena ovojnica - točkasta (AC-12)

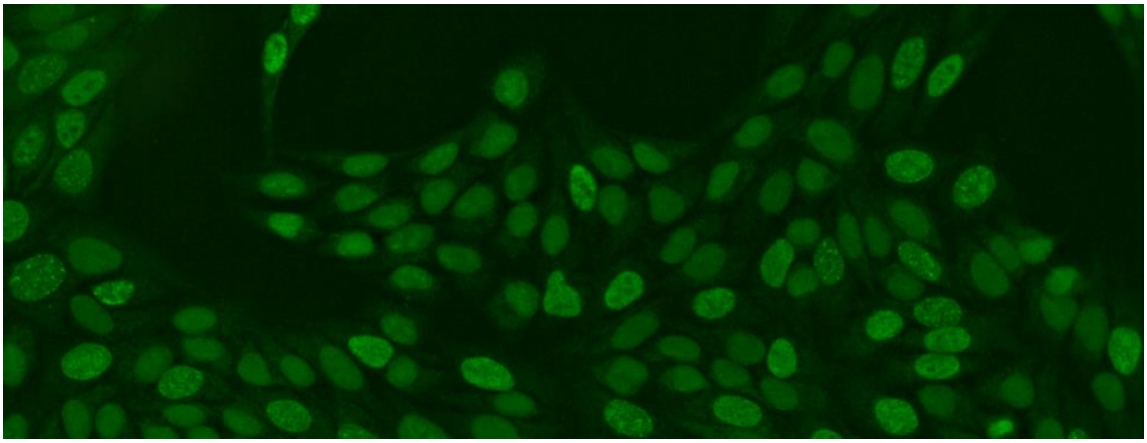
Točkasta obojenost jezgara interfaznih stanica uz izraženo pojačanje fluorescencije uz rub jezgre te naglašena fluorescencija na dodirnom mjestu dviju susjednih jezgara označava nalaz postojanja protutijela usmjerenih na pore u jezgrenoj ovojnici, najčešće na protein gp210 koji je sastavni dio tih pora, ali povremeno i na antigene p62 nukleoporin, LBR i Tpr. Kao i kod prethodnog obrasca, nema bojenja kromatinskih masa (Slika 13). Ovaj se obrazac najčešće vezuje za autoimunosne bolesti jetre (pretežno PBC), a povremeno se može vidjeti i u sistemskim autoimunosnim reumatskim bolestima (177,178).



Slika 13. Obrazac fluorescencije AC-12 na stanicama HEp-2.

Pleomorfni – tip PCNA (AC-13)

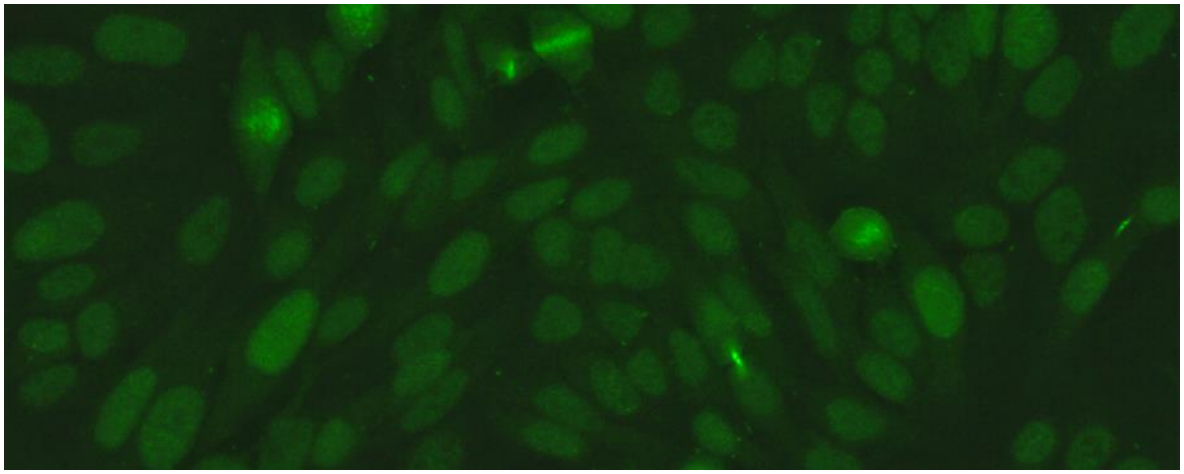
Obilježje ovog obrasca je pleomorfno bojenje interfaznih stanica: neke su jezgre intenzivno obojene uz točke i polja fluorescencije različitog intenziteta, neke pokazuju samo pojedine svijetle točke u nukleolusima, a neke se uopće ne boje (Slika 14). Jedini antigen koji je trenutačno poznat kao meta protutijela kod ovog obrasca je PCNA. Ranije se ovaj obrazac povezivao isključivo uz SLE, ali prema novijim istraživanjima on se može vidjeti i u nizu drugih autoimunosnih bolesti te u hepatitisu C (179).



Slika 14. Obrazac fluorescencije AC-13 na stanicama HEp-2.

Pleomorfni – CENP-F (AC-14)

Kod ovog je obrasca također vidljiva naglašena raznolikost točkastog bojenja jezgre, kako u interfaznim stanicama (jako bojenje stanica u G2-fazi, odsutno u G1-fazi), tako i u staničnoj diobi, uz razlike u pojedinim fazama mitoze (Slika 15). Ovaj je obrazac povezan s protutijelima na CENP-F koja najčešće označavaju prisutnost maligne bolesti, ali su prisutna samo u vrlo malom postotku tih bolesnika. Sporadično se mogu pronaći i u manjeg broja bolesnika s raznim upalnim i autoimunosnim bolestima (180).



Slika 15. Obrazac fluorescencije AC-14 na stanicama HEp-2.

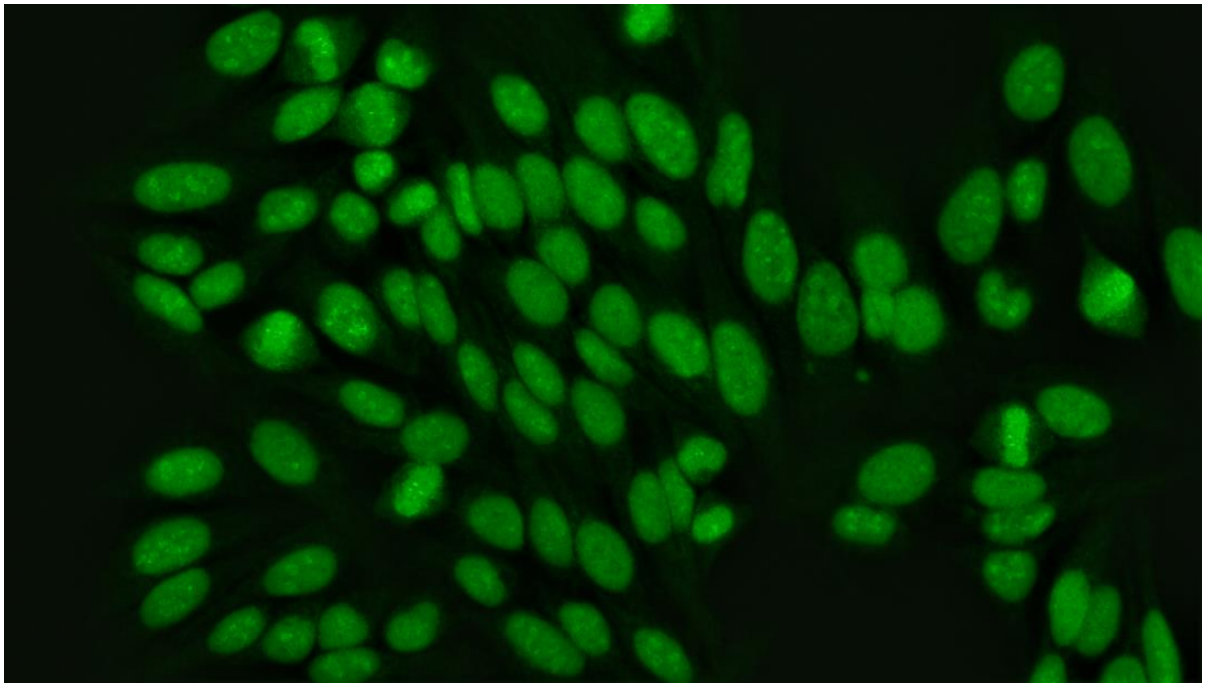
Tip Topo I (AC-29)

Ovaj je obrazac nedavno definiran kao zaseban, što je rezultiralo i njegovom najvišom brojevnom oznakom usprkos smještaju u dijelu klasifikacijskog stabla s nižim brojevnim oznakama (jezgreni obrasci IIF). Definiran je istodobnim nalazom pet zasebnih obrazaca IIF (Slika 16):

1) obrascem nalik na obrazac AC-4 u interfaznim stanicama;
2) sitno točkastim bojenjem kromatina u stanicama u mitozi;
3) jakim bojenjem NOR regije u stanicama u mitozi;
4) slabim citoplazmatskim mrežastim bojenjem koje slabi od jezgre prema periferiji;
5) polimorfnim bojenjem nukleolusa.

Postoje poteškoće kod detektiranja ovog obrasca upotrebom poluautomatiziranih sustava za IIF s obzirom na to da takvi sustavi temelje detekciju obrasca na izboru pojedinih fokalnih presjeka vidljivih fluorescentnim mikroskopom, a velika je vjerojatnost da je za detekciju svih komponenti ovog obrasca potrebno promatrati uzorak u više fokalnih ravnina (157).

Klinički, ovaj je obrazac IIF visoko specifičan za sistemsku sklerozu, posebice za difuzni kutani oblik ove bolesti, kao i njezine agresivnije oblike (157,181).

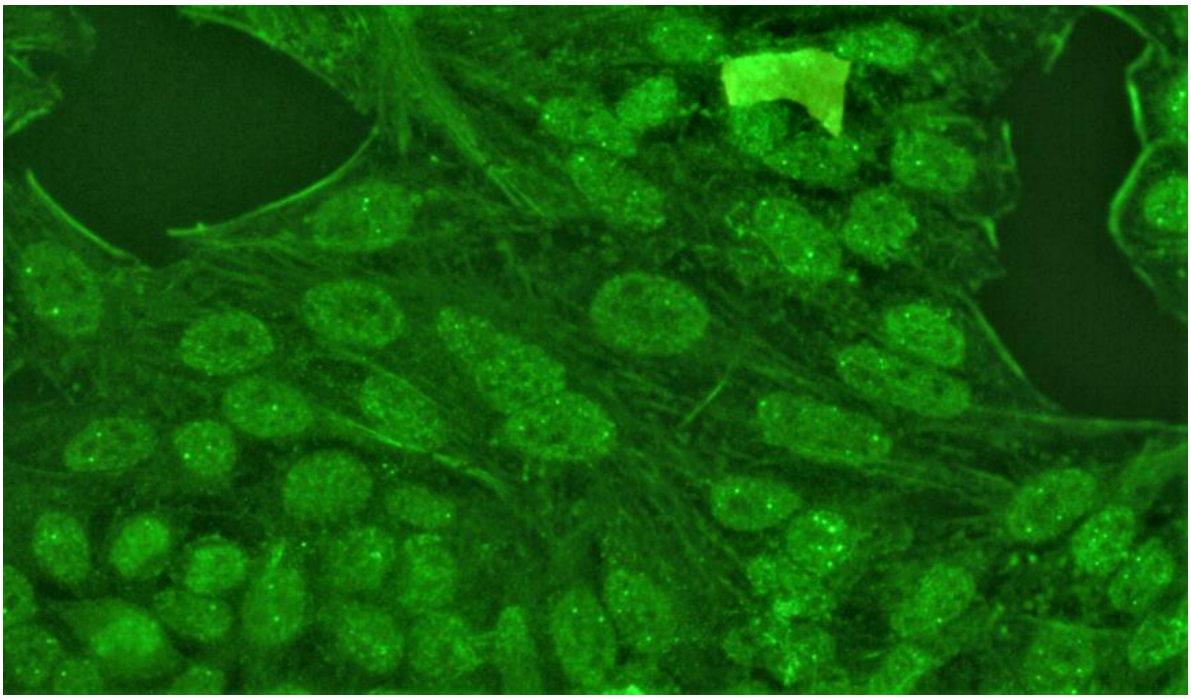


Slika 16. Obrazac fluorescencije AC-29 na stanicama HEp-2.

1.6.2.2. Citoplazmatski obrasci imunofluorescencije

Fibrilarni linearni (AC-15)

U ovom obrascu fluoresciraju vlakna staničnog citoskeleta, najčešće po uzdužnoj osi stanice (Slika 17). Ova je pojava većinom rezultat postojanja protutijela koja se vežu na aktin, što označava autoreaktivnost na glatke mišićne stanice i jedan od kriterija za postavljanje dijagnoze autoimunosnog hepatitisa tipa 1. Najčešće je riječ o reakciji protiv F-aktina, dok su protutijela na G-aktin od manje kliničke važnosti. Osim u ovoj bolesti, obrazac AC-15 može se uočiti u hepatitisu C i celijakiji, dok je rijedak u reumatskim bolestima (182,183).

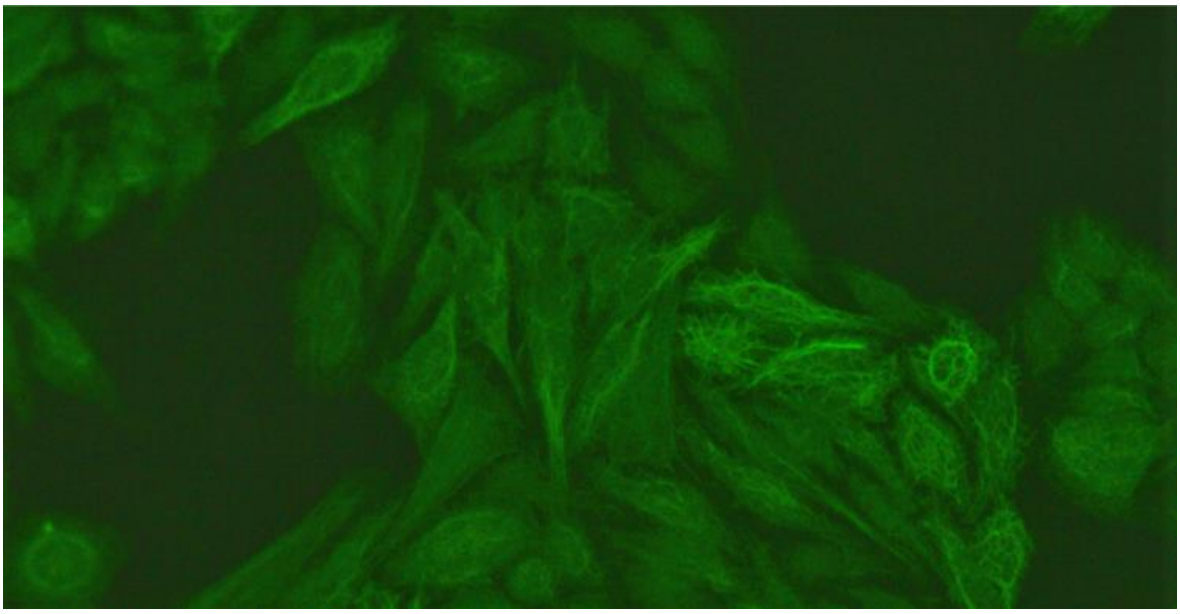


Slika 17. Obrazac fluorescencije AC-15 na stanicama HEp-2.

Fibrilarni nitasti (AC-16)

Bojenje mikrotubula koji se šire od jezgre označava prisutnost protutijela usmjerenih na komponente tih struktura, kao što su citokeratini, vimentin, dezmin, tubulin i tropomiozin (Slika 18). U slučaju protutijela na vimentin, nalaze se mnogostruke fine niti zrakasto položene u citoplazmi oko jezgre u vrtložastom položaju. Doima se kao da niti povezuju jezgrenu i staničnu membranu. U slučaju protutijela na dezmin, pojavljuje se fino nitasto bojenje citoplazme koje se doima kao da pruža strukturnu potporu kontraktilnom sustavu

stanice, a u stanicama u mitozi vidljive su citoplazmatske točke. U slučaju protutijela na citokeratine vidi se mrežasta struktura niti kroz citoplazmu, a tijekom mitoza filamenti se raspadnu i nakupljaju u citoplazmatske točke. Protutijela na tropomiozin očituju se kao niti koje prolaze cijelom duljinom stanice i koje se doimaju kao da stanicu drže napetom (184). Sporadično se ovaj obrazac uočava u mnogim bolestima, ali rijetko u reumatskim autoimunosnim bolestima. Protutijela na citokeratine česta su u autoimunosnom hepatitisu i kroničnim plućnim bolestima, dok se protutijela na tubuline dovode u vezu s nekim oblicima polineuropatija, a česta su i u bolesnika s alkoholnom bolešću jetre. Protutijela na vimentin česta su u bolesnika s neurofibromatozom (185-187).

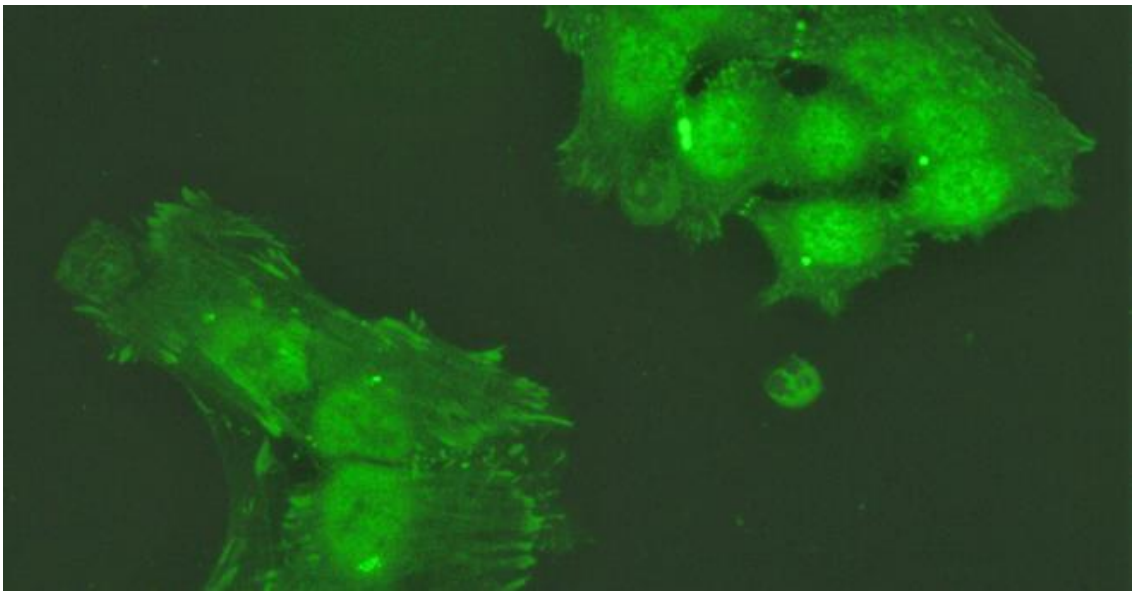


Slika 18. Obrazac fluorescencije AC-16 na stanicama HEp-2.

Fibrilarni segmentirani (AC-17)

Kod ovog obrasca fluorescencije karakteristično su vidljivi kratki odsječci vlakana koja se protežu citoplazmom, a što najčešće označava protutijela na α-aktinin i vinkulin. U stanicama u mitozi se u slučaju protutijela na vinkulin vide citoplazmatske točke (Slika 19). Ovaj obrazac također se viđa i kod protutijela usmjerenih na sidrišne (prema engl. *anchoring*) bjelančevine stanice. Tada su vidljive kratke poveznice citoskeletnih filamenata i stanične membrane te izvanstaničnog matriksa ili susjednih stanica. Ovaj rijedak obrazac IIF nije jasno doveden u vezu ni s jednom bolešću, ali je poznato da su protutijela na α-aktinin dobar biljeg razlikovanja SLE sa zahvaćanjem bubrega (gdje su prisutna), od SLE bez zahvaćanja

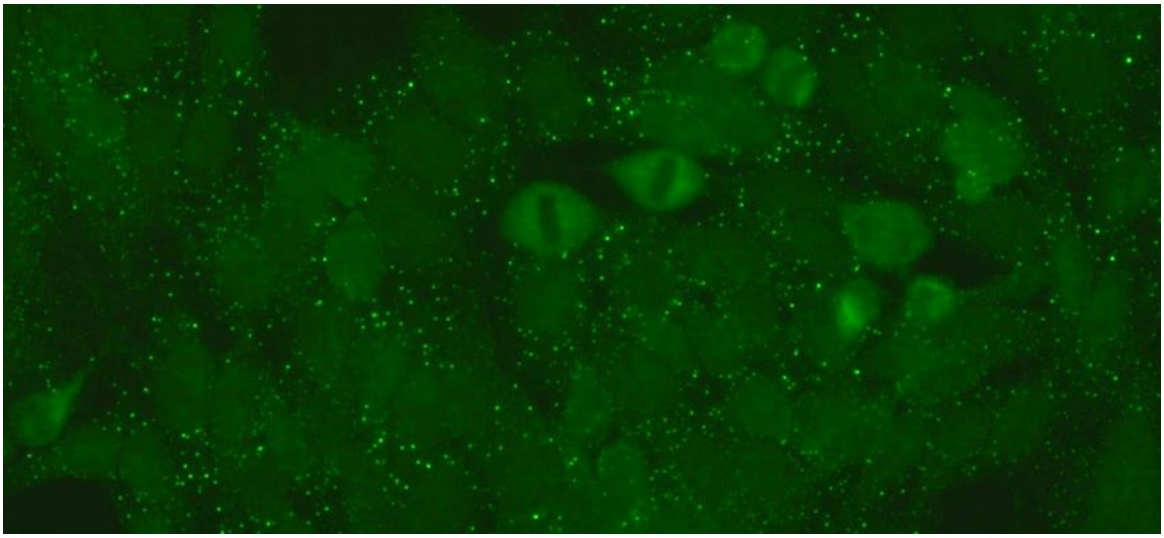
bubrega (nisu prisutna). Ona su također prisutna u visokom postotku i u bolesnika s autoimunosnim hepatitisom. Protutijela na vinkulin nedavno su pronađena u manjeg postotka bolesnika s kroničnom upalnom demijelinizacijskom polineuropatijom (CIDP, prema engl. *chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*)(188-190).



Slika 19. Obrazac fluorescencije AC-17 na stanicama HEp-2.

Točkasti - pojedine točke (AC-18)

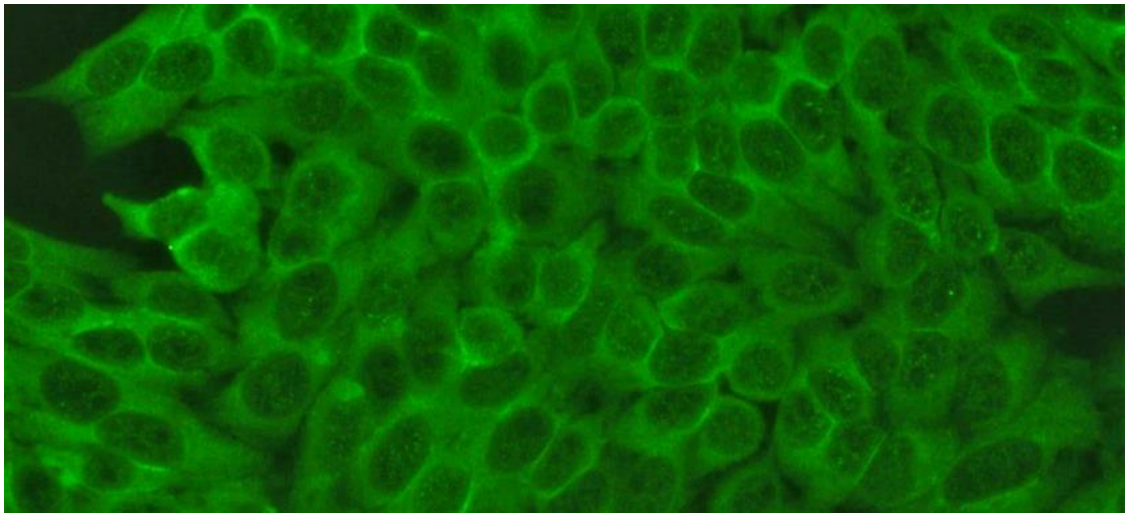
Pojedine točke u citoplazmi koje se boje u ovom obrascu po novijim spoznajama označavaju tjelešca GW (odnosno P-tjelešca) koja se sastoje od enzima koji sudjeluju u procesiranju mRNA (Slika 20). Protutijela najčešće reagiraju na antigene GW182 ili Su/Ago2 tih tjelešaca. Često se pojavljuju u bolesnika s raznovrsnim neurološkim simptomima, kao i u autoimunosnim reumatskim bolestima i PBC. Iako ne postoje molekularni dokazi da je ovaj obrazac povezan s lizosomskim antigenima, često se u literaturi sreće opis ovog obrasca kao lizosomski. Slično vrijedi i za peroksisome (191,192).



Slika 20. Obrazac fluorescencije AC-18 na stanicama HEp-2.

Točkasti – gusti fino granulirani (AC-19)

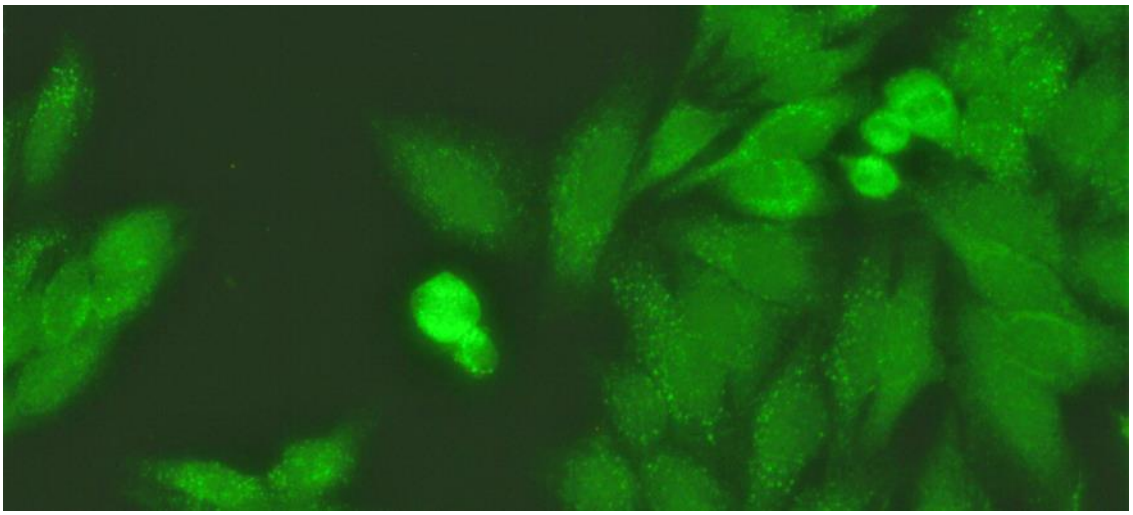
U ovom je obrascu granulirana fluorescencija prisutna u cijeloj citoplazmi te je gotovo, ali ne potpuno, homogena (Slika 21). Antigeni na koje su protutijela usmjerena u ovom obrascu najčešće su tRNA sintetaze PL-7 (treonil-tRNA-sintetaza) koja se učestalo javljaju u antisintetaznom sindromu, zatim PL-12 i ribosomska P-tjelešca koja se nalaze u bolesnika sa SLE (pogotovo s neuropsihijatrijskim simptomima). Protutijelo anti-SRP također daje ovaj obrazac IIF, a susrećemo ga u imunosno posredovanoj nekrotizirajućoj miopatiji (193-195).



Slika 21. Obrazac fluorescencije AC-19 na stanicama HEp-2.

Fino točkasti (AC-20)

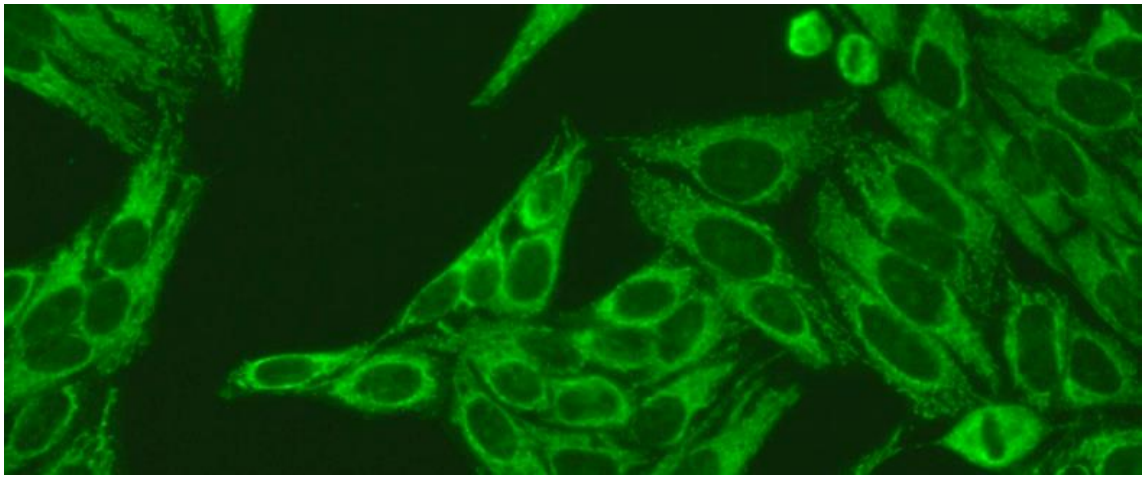
Ovaj se obrazac definira kao gusto fino točkasta ili homogena citoplazmatska fluorescencija uz prisutne jasno vidljive pojedine sitne točkice superponirane na tu podlogu (Slika 22). Jedno od protutijela koje je povezano s ovim obrascem je anti-Jo-1 usmjereno na histidil-tRNA-sintetazu, a također se najčešće nalazi u bolesnika s antisintetaznim sindromom. Budući da je pozitivan nalaz ovog protutijela jedan od klasifikacijskih kriterija za idiopatske upalne miopatije, a može ostati i nedetektirano na HEp-2 stanicama, u slučaju kliničke sumnje na ovo stanje preporučljivo je učiniti specifični test za njegovu detekciju (193,196).



Slika 22. Obrazac fluorescencije AC-20 na stanicama HEp-2.

AMHA (AC-21)

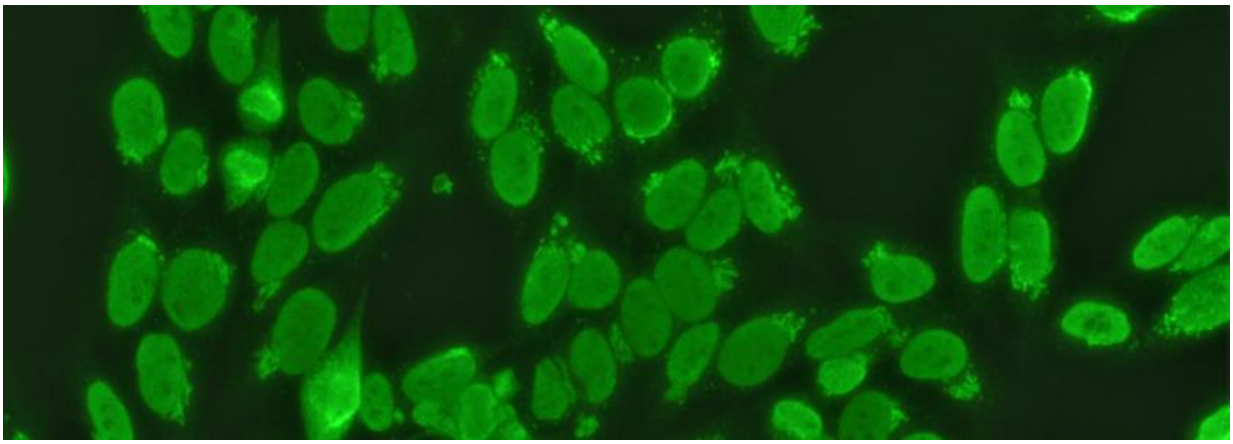
U ovom je obrascu fluorescencija citoplazme specifično filamentozna kao posljedica postojanja protutijela na određene antigene u mitohondrijima, najčešće PDC-E2/M2, BCOADC-E2, OGDC-E2, E1α podjedinicu PDC ili E3BP/bjelančevinu X (Slika 23). Klinički se najčešće povezuje s primarnim bilijarnim kolangitisom, ali nerijetko se nalazi i u sindromima preklapanja te bolesti sa Sjögrenovim sindromom i sistemskom sklerozom (197,198).



Slika 23. Obrazac fluorescencije AC-21 na stanicama HEp-2.

Golgi (AC-22)

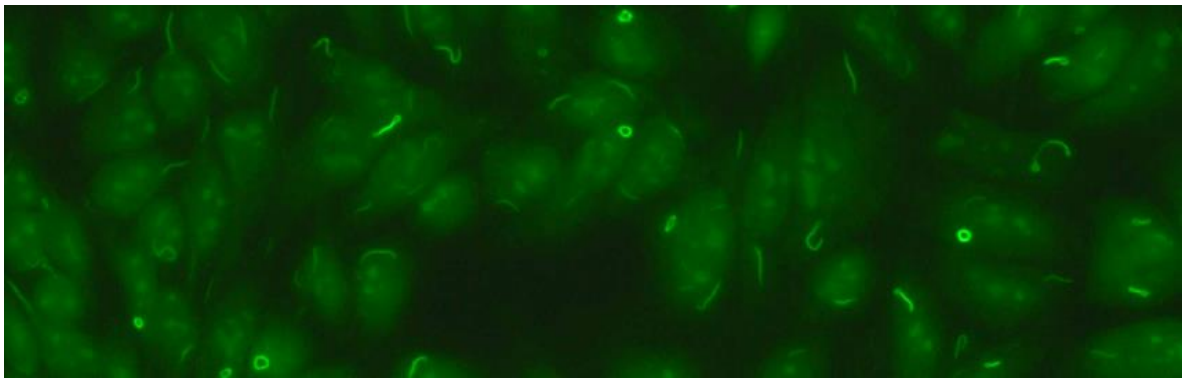
Karakteristična fluorescencija ovog obrasca je unipolarni, perinuklearni, trakasti pojas koji odaje točkasti ili granulirani dojam (Slika 24). Protutijela koja su odgovorna za ovaj obrazac usmjerena su na antigene koji se nalaze u Golgijevu tjelešcu, najčešće giantin (makrogolgin) i razne varijante golgina. S obzirom na to da je ovaj obrazac rijedak, nema jasnih naznaka koji bi ga povezali s određenom bolešću, ali može se povremeno uočiti u bolesnika s malignim bolestima, neurološkim bolestima, pa i reumatskim autoimunosnim bolestima, kao i u virusnim infekcijama (ponajprije Epstein-Barrinim virusom i virusom humane imunodeficijencije) (129,192,193).



Slika 24. Obrazac fluorescencije AC-22 na stanicama HEp-2.

Štapići i prstenovi (AC-23)

Ovaj specifičan obrazac obilježava prisutnost pojedinih fluorescirajućih struktura u citoplazmi oblika štapića i prstenova (Slika 25). Po dostupnim literaturnim podatcima, daleko se najčešće javlja u bolesnika s infekcijom hepatitisom C koji su liječeni ribavirinom i pegiliranim interferonom. Opisana je njegova pojava i u bolesnika sa SLE koji su liječeni određenim imunosupresivnim lijekovima. Može se naći i u zdravoj populaciji kada je nepoznate važnosti. Smatra se primjerom autoimunosne reakcije izazvane farmakoterapijom (200,201).

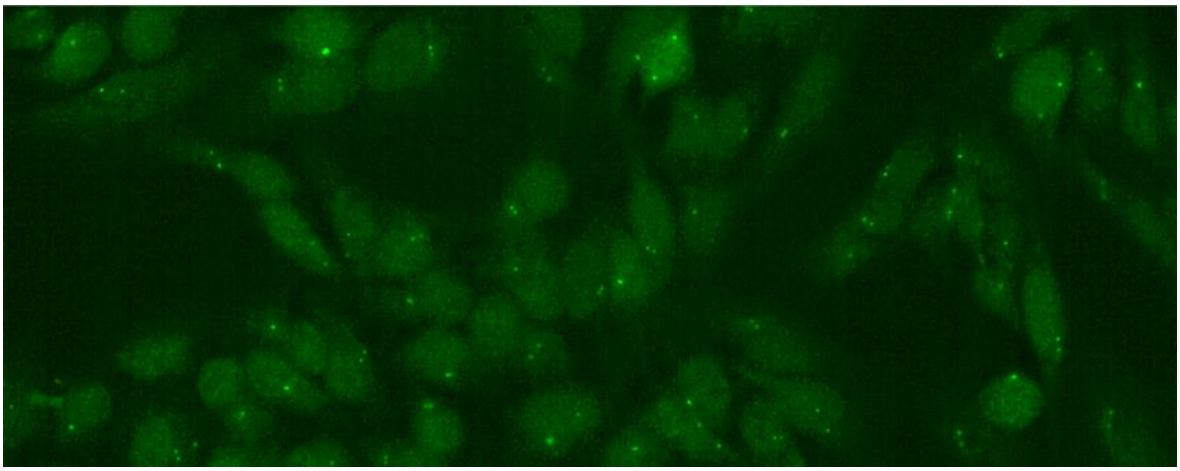


Slika 25. Obrazac fluorescencije AC-23 na stanicama HEp-2.

1.6.2.3. Mitotski obrasci imunofluorescencije

Centrosomi (AC-24)

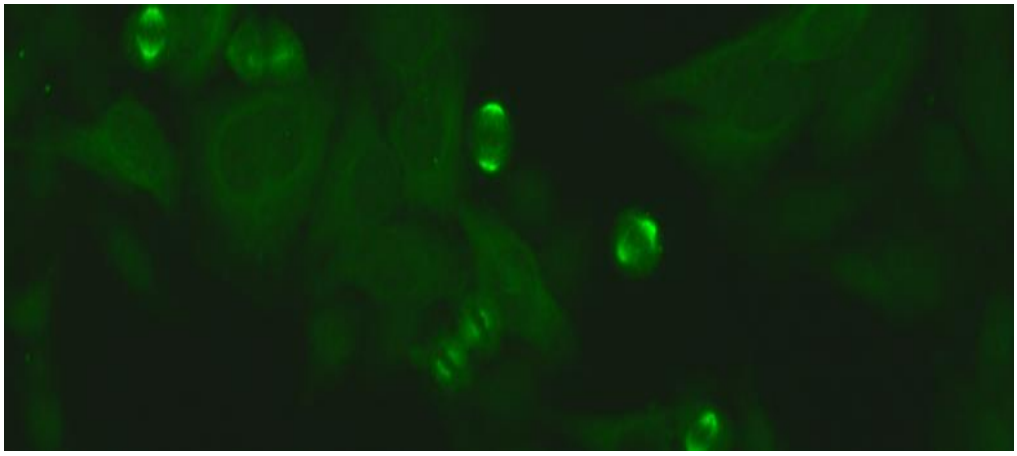
U ovom obrascu boje se strukture još nazvane i centriolima, koje se nalaze na krajevima mitotskog vretena, a izvan mitoze mogu se vidjeti u citoplazmi. U stanici se mogu vidjeti jedna do dvije ove strukture (Slika 26). Ovaj obrazac nije jasno povezan niti s jednim stanjem, ali se protutijela na komponente centrosoma mogu povremeno naći kod bolesnika sa sistemskom sklerozom te rjeđe kod SLE ili reumatoidnog artritisa. Izvan spektra reumatskih bolesti važno je njihovo učestalo pojavljivanje kod osoba s karcinomom dojke (202-204).



Slika 26. Obrazac fluorescencije AC-24 na stanicama HEp-2.

Diobeno vreteno (AC-25)

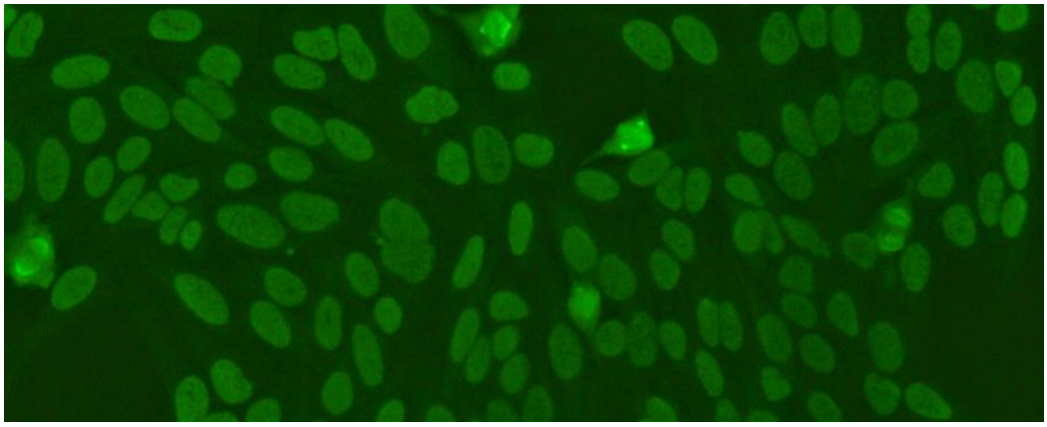
Diobena vretena jasno fluoresciraju u mitotskim stanicama u ovom obrascu, skupljajući se prema polovima (Slika 27). Najpoznatiji antigen koji se vezuje uz ovaj obrazac IIF je HsEg5. Ova protutijela, zbog njihova rijetkog pojavljivanja, nisu jasno povezana niti s jednom bolešću. Postoje jedino naznake da se ona češće pojavljuju kod bolesnika sa SLE ili Sjögrenovim sindromom (205,206).



Slika 27. Obrazac fluorescencije AC-25 na stanicama HEp-2.

Tip *NuMA (AC-26)*

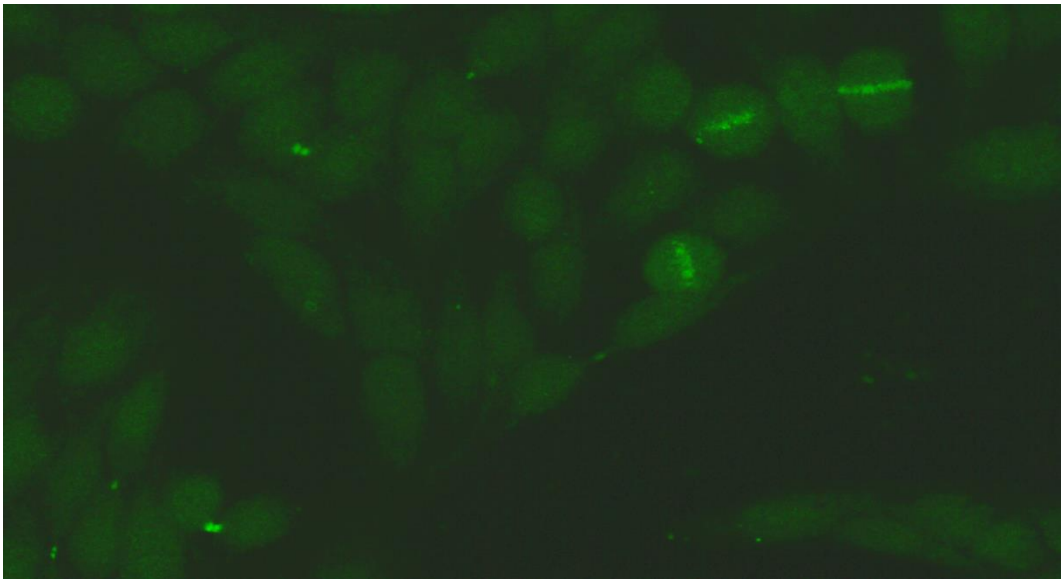
Ovaj se obrazac definira kao AC-25 obrazac kod kojeg je prisutna i točkasta fluorescencija u jezgri (Slika 28). Antigen koji se najčešće vezuje uz ovaj obrazac dao mu je i ime (NuMA), a za razliku od AC-25, jasno je povezan s autoimunosnim reumatskim bolestima. Ipak, dijagnostičku vrijednost umanjuje činjenica da ga se opaža vrlo rijetko (205,207).



Slika 28. Obrazac fluorescencije AC-26 na stanicama HEp-2.

Međustanični most (AC-27)

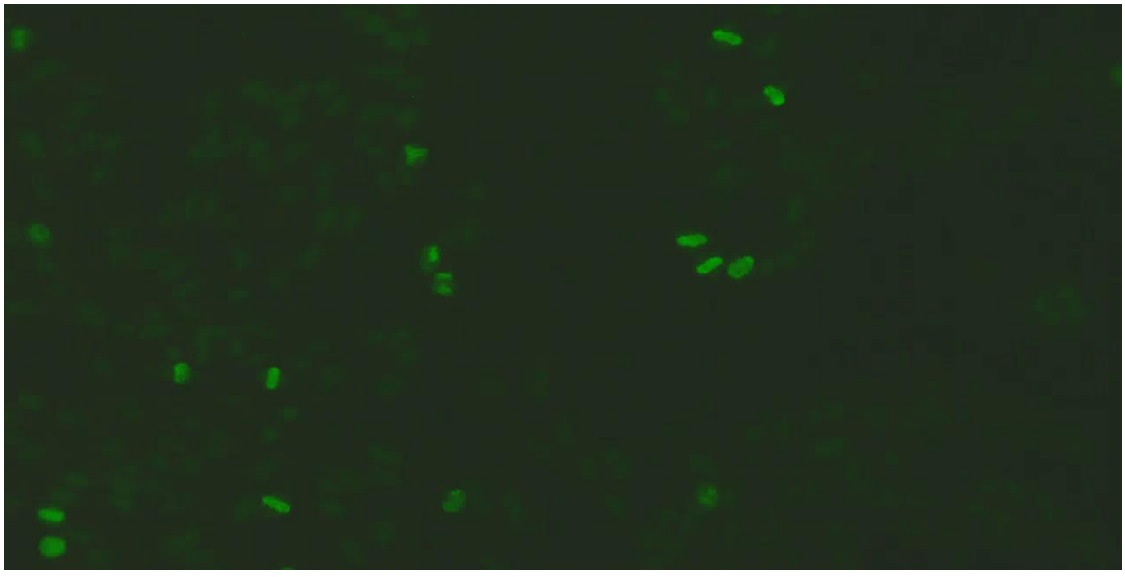
Kod ovog specifičnog obrasca IIF obojen je međustanični most, struktura na razmeđi dviju stanica na kraju mitoze, koje su tik pred odvajanjem jedna od druge (Slika 29). Opaža se izrazito rijetko, pa se usprkos činjenici da su pronađeni neki antigeni koji se povezuju s ovim obrascem nije uspjela pronaći jasna povezanost s bilo kojom bolešću (208,209).



Slika 29. Obrazac fluorescencije AC-27 na stanicama HEp-2.

Mitotski kromosomski (AC-28)

Kod ovog obrasca, vidljivog samo u profaznim i metafaznim stanicama u mitozi, vidljivo je točkasto obojenje kromosomskih struktura (Slika 30). Ovaj se obrazac također opaža vrlo rijetko, ali su opisani određeni antigeni u kromosomskim strukturama, neki vjerojatno odgovaraju histonima, a neki su nepoznate prirode. Ova protutijela opisivana su kod bolesnika sa SLE, s malignomima, Sjögrenovim sindromom i reumatskom polimijalgijom (210,211).



Slika 30. Obrazac fluorescencije AC-28 na stanicama HEp-2.

2. Hipoteza

Pojedini rjeđi obrasci indirektne imunofluorescencije na stanicama HEp-2 imaju određene karakteristike te su povezani sa specifičnim autoimunosnim kliničkim entitetima i specifičnim autoprotutijelima povezanim s tim entiteima.

3. Ciljevi

3.1. Opći cilj

Istražiti karakteristike rijetkih obrazaca indirektne imunofluorescencije na stanicama HEp-2.

3.2. Specifični ciljevi

1. Utvrditi učestalost pojedinih rijetkih obrazaca imunofluorescencije.

2. Utvrditi povezanost dobivenih obrazaca imunofluorescencije sa spolom i dobi ispitanika.

3. Utvrditi učestalost istodobne prisutnosti drugih, učestalijih obrazaca imunofluorescencije (preklapanje obrazaca).

4. Utvrditi povezanost rijetkih obrazaca imunofluorescencije s prisutnošću pojedinih specifičnih protutijela.

5. Utvrditi postojanje eventualne razlike u učestalosti nalaza pojedinih specifičnih protutijela kod učestalih obrazaca imunofluorescencije u ovisnosti o istodobnoj prisutnosti rijetkih obrazaca imunofluorescencije.

6. Utvrditi povezanost između nalaza pojedinih rijetkih obrazaca imunoflourescencije, samostalno prisutnih ili u kombinaciji s drugim obrascima, s pojedinim kliničkim dijagnozama bolesti.

4. Materijali i metode

4.1. Uzorci uključeni u analize

U ovo istraživanje uključeno je 10955 uzoraka ispitanika koji su upućeni na dijagnostiku prisutnosti ANA u Referentni centar za imunodijagnostiku imunoloških i hematoloških bolesti koji se nalazi u sklopu Odjela za laboratorijsku imunologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb. ANA i specifična protutijela iz skupine ANA akreditirana su pretraga sukladno normi HR EN ISO 15189. Ispitanici su na pretragu upućeni od specijalista tijekom liječenja u klinikama KBC-a Zagreb (uglavnom Zavod za kliničku imunologiju i reumatologiju, Zavod za nefrologiju, Zavod za gastroenterologiju i hepatologiju, Klinika za reumatske bolesti i rehabilitaciju, srodni zavodi Klinike za pedijatriju), kao i od liječnika obiteljske medicine bilo samoinicijativno ili na preporuku specijalista. U obzir je uziman samo prvi uzorak od istog ispitanika tako da eventualna naknadna određivanja prisutnosti ANA kod istog ispitanika nisu uzimana u obzir. Analizirani su uzorci pristigli na određivanje prisutnosti ANA u razdoblju od 18 mjeseci.

Kontrolna skupina, predviđena za usporedbu s analiziranim svojstvima pojedinih rijetkih obrazaca IIF, sastavljena je od 219 uzastopnih ANA-pozitivnih (metodom IIF na HEp-2 stanicama) uzoraka pristiglih na analizu ANA u gore spomenuti laboratorij. Iz gore navedene kontrolne skupine isključeni su uzorci u kojih je nađena prisutnost nekog od rijetkih obrazaca IIF pa je stoga čine uzorci s uobičajenim obrascima IIF koji se najčešće uočavaju u rutinskim analizama. Ova svojstva čine kontrolnu skupinu reprezentativnom i pogodnom za usporedbu s uzorcima u kojima su uočeni rijetki obrasci IIF.

4.2. Postupanje s uzorcima

Uzorci ispitanika pristizali su na analizu dvama putovima. U prvom je slučaju ispitanicima naručenima u prijamnu ambulantu uzorak uzimalo osoblje Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku. Ovdje se radi o ispitanicima koji su upućeni ambulantno temeljem uputnice liječnika obiteljske medicine. U drugom slučaju radi se o ispitanicima na liječenju u nekoj od klinika KBC-a Zagreb, a u tom slučaju uzorke krvi uzimaju medicinske sestre ili tehničari tih odjela, nakon čega se dopremaju na daljnje postupanje u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku. U oba slučaja prati se standardni postupak za postupanje s uzorcima tjelesnih tekućina ispitanika sukladno internim aktima Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku. Uzorci za serumske pretrage, među koje se ubraja i dijagnostika ANA, uzimaju se u standardne epruvete s aktivatorom zgrušavanja. Venepunkcijom se u navedene epruvete uzima 3 mL pune krvi, koja se nakon razdoblja mirovanja na sobnoj temperaturi od 20 do 30 minuta centrifugira na 3750 okretaja u minuti tijekom 10 minuta. Ovaj postupak omogućuje odjeljivanje seruma od ostalih komponenata krvi i njegovo uzorkovanje u manje spremnike za analizu ili pohranu. Za potrebe dijagnostike ANA tako pripremljeni uzorci zamrzavaju se do analize na -20 °C. Svim je uzorcima po pristizanju u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku dodijeljen jedinstveni identifikacijski kod koji služi za daljnju identifikaciju uzorka, pri čemu su izostavljeni osobni i klinički podaci ispitanika, a što osigurava zaštitu osobnih podataka ispitanika. Kasnije, nakon prikupljanja podataka povezanih s dijagnostikom ANA, iz bolničkoga su informacijskog sustava preuzeti relevantni podaci povezani s demografskim karakteristikama ispitanika čiji su uzorci analizirani, kao i vodeće kliničke dijagnoze pod kojima su ti ispitanici upućeni na dijagnostiku ANA.

4.3. Analiza antinuklearnih protutijela

4.3.1. Indirektna imunofluorescencija na stanicama HEp-2

Stanice HEp-2 su stanična linija za koje se smatra da potječu iz ljudskog karcinoma larinksa, ali se najvjerojatnije radi o stanicama HeLa kojima je još u šezdesetim godinama prošlog stoljeća kontaminirana originalna stanična linija, a koje su postupno istisnule izvorni stanični soj. Ova činjenica nije problematična za dijagnostiku ANA, koja se u svakom slučaju radi na tim stanicama već desecima godina, tako da su rezultati svih istraživanja međusobno usporedivi. No, može dovesti u zabludu istraživače koji bi na istoj staničnoj liniji pokušali izvući zaključke o osobitostima stanica proliferativne bolesti larinksa (7). U studiji je korištena standardizirana podloga sa stanicama HEp-2 nanesenim u tankom sloju (Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Njemačka), koja se inkubira u razdoblju od 30 minuta na sobnoj temperaturi s uzorcima seruma razrijeđenima u omjeru 1 : 100. Kao medij za razrjeđivanje koristi se fosfatom puferirana fiziološka otopina koja sadržava komercijalni neionski deterdžent Tween 20 (PBS-Tween). Podloga se nakon te inkubacije ispire tijekom pet minuta u istoj otopini. Nakon ovog postupka na pojedinim dijelovima stanica nanesenih na podlogu ostaju vezana protutijela iz seruma ispitanika (ako su prisutna). Mjesto vezanja ovisi o specifičnosti za pojedini unutarstanični antigen. Vezana protutijela prikazuju se s pomoću sekundarnih protutijela usmjerenih na nepromjenjivi dio ljudskih imunoglobulina. Ta detekcijska protutijela konjugirana su fluorescentnom bojom fluorescein-izotiocijanat (FITC, prema engl. *fluorescein isothiocyanate*), a inkubacija sa sekundarnim protutijelom traje dodatnih 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega slijedi ponovno ispiranje nevezanog protutijela. Ovakav postupak rezultira fluorescencijom stanica na specifičnim mjestima te je moguće odrediti obrazac fluorescencije promatrajući stanice s pomoću svjetlosnoga fluorescentnog mikroskopa. Svi su uzorci klasificirani sukladno ranije obrađenim smjernicama, pri čemu je nepristranost osigurana činjenicom da stručnjak koji analizira uzorke nije upoznat s identitetom ispitanika niti njihovim demografskim ili kliničkim karakteristikama prije analize uzoraka.

4.3.2. Analiza specifičnih protutijela

U uzorcima u kojih je metodom IIF utvrđena prisutnost protutijela ANA slijedi utvrđivanje specifičnosti protutijela usmjerenih na stanične komponente. Ovaj postupak provodi se s pomoću metode koja se koristi u svakodnevnoj laboratorijskoj praksi, a temelji se na predefiniranoj mješavini najčešćih ciljnih antigena za protutijela u bolestima za koje se smatra da su povezane s prisutnošću protutijela na unutarstanične antigene.

Konkretan sustav korišten u ovom istraživanju je Theradiag FIDIS™ Connective Profile (Theradiag, Croissy Beaubourg, Francuska). Sustav se temelji na polistirenskim mikrokuglicama čija je svaka podvrsta konjugirana sa specifičnim antigenom. Mikrokuglice se najprije inkubiraju s razrijeđenim uzorcima seruma. Nakon inkubacije ispire se suvišak seruma, a mikrokuglice se inkubiraju s protutijelima specifičnim za Fc-odsječak ljudskih protutijela. Ta su protutijela konjugirana sa specifičnom fluorescentnom bojom fikoeritrinom (PE). Ovakvo obilježavanje sekundarnog protutijela omogućuje kvantitativnu ili polukvantitativnu detekciju eventualno prisutnog protutijela. Budući da se ovaj sustav temelji na sustavu Luminex® 100/200™ s tehnologijom xMAP® (Luminex Corporation, Austin, Teksas, SAD), detekcija se odvija tako da mikrokuglice u tankoj cjevčici prolaze kroz dva snopa laserskih zraka, od kojih jedan klasificira mikrokuglice po vrsti (što omogućuje određivanje vrste protutijela, a time i autoantigena) dok drugi snop služi za određivanje intenziteta fluorescencije PE koja je proporcionalna koncentraciji protutijela u uzorku. Navedeni sustav omogućuje polukvantitativno određivanje 14 protutijela koja se u velikom broju slučajeva susreću u bolesnika s autoimunosnim reumatskim bolestima, a to su anti-dsDNA, anti-SS-A (60kDa), anti-TRIM21, anti-SS-B, anti-Sm, anti-Sm/RNP, anti-Scl-70, anti-Jo-1, anti-ribosomske bjelančevine, anti-centromere (CENP-B), anti-PmScl, anti-PCNA, anti-histoni i anti-U1-RNP.

4.4. Kliničke dijagnoze

Kliničke dijagnoze označavaju uputne dijagnoze koje su zabilježene kroz bolnički informacijski sustav prilikom obrade uputnica (internih bolničkih uputnica u slučaju upućivanja ispitanika tijekom bolničkog liječenja na nekom od odjela KBC-a Zagreb te vanjske uputnice pristigle iz drugih zdravstvenih ustanova i od liječnika obiteljske medicine).

Uputne dijagnoze podijeljene su u pet skupina prema kodovima MKB-10 pridruženima u uputnoj dokumentaciji. Prva skupina uključuje ispitanike s dijagnozom neke od sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti, s MKB-10 kodovima od M30 do M36, druga skupina ispitanike s upalnim artropatijama, s kodovima od M05 do M14. Izdvojene su još dijagnoze jetrenih bolesti, s kodovima K70 do K77 te dijagnoze povezane s tumorima s kodovima C00 do D48. Peta skupina uključuje preostale ispitanike koji su upućeni pod raznim drugim sporadičnim dijagnozama koje se ne mogu na smislen način grupirati u daljnje podskupine.

4.5. Statističke metode

U ovom su istraživanju za analizu razlika među dvjema kontinuiranim varijablama korišteni parametarski (Studentov t-test) ili neparametarski (Mann-Whitneyjev U-test) testovi, ovisno o distribuciji podataka u analiziranoj skupini. Raspodjela podataka ispitana je s pomoću Kolmogorov-Smirnovljevog testa u kojemu se pri p vrijednosti > 0,05 raspodjela smatra normalnom.

Za usporedbe skupina prema nezavisnim dihotomnim ili višestrukim kriterijima korišten je χ^2 test ili Fisherov test.

Razina statističke važnosti postavljena je na < 0,05, pri čemu se pri vrijednostima ispod te razine odbacuje nul-hipoteza.

Sve analize u ovom istraživanju provedene su s pomoću statističkog programa Statistica, verzija 13.3.0 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornija, SAD).

4.6. Odobrenja

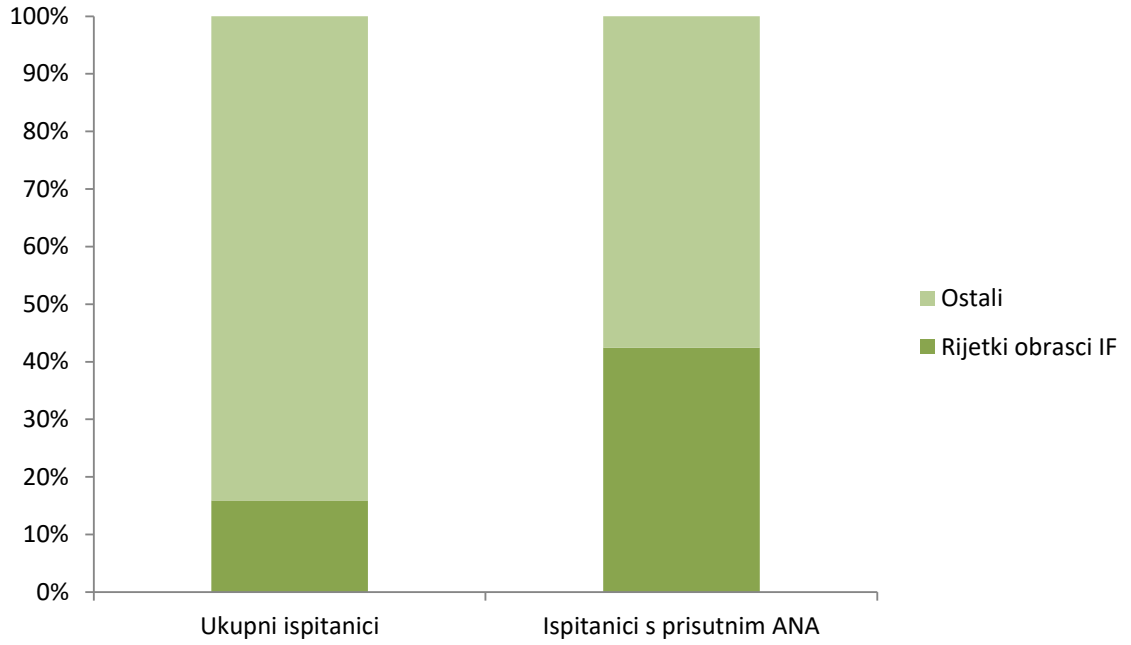
Metodologija ovog istraživanja, način prikupljanja podataka, kao i postupanja pri obradi uzoraka odobreni su od Etičkog povjerenstva KBC-a Zagreb te od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

5. Rezultati

5.1. Obilježja ispitivane i kontrolne skupine

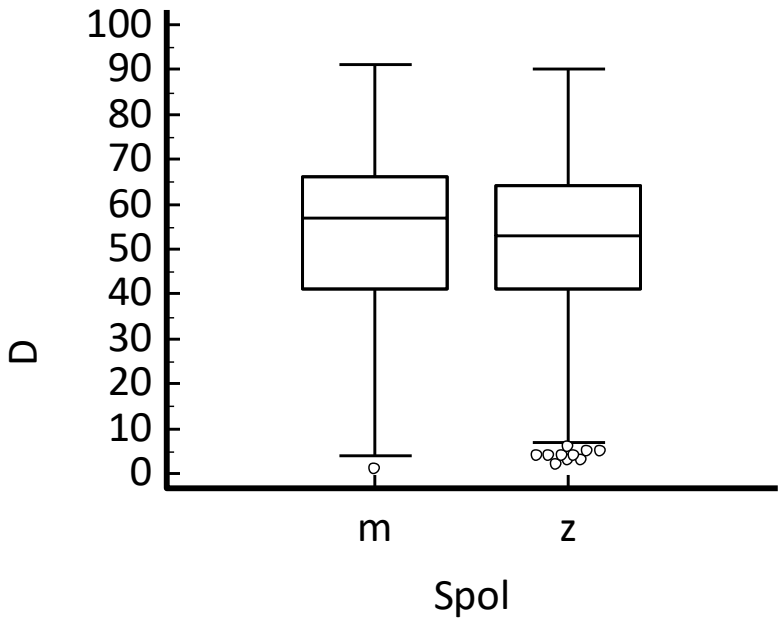
Ispitivana skupina

Od ukupno 10955 ispitanika uključenih u ovu studiju, prisutnost ANA metodom IIF na stanicama HEp-2 utvrđena je u 4107 uzoraka (37,48 %). Među ANA-pozitivnim ispitanicima, rijetki obrasci imunofluorescencije evidentirani su u 1743 slučaja. Rijetkim su obrascima smatrani oni koji su se u ukupnom broju ispitanika pojavljivali s učestalošću manjom od 3 %, bez obzira na to je li istodobno uočena i prisutnost nekog od uobičajenih obrazaca imunofluorescencije. Ukupni udio uzoraka s prisutnim rijetkim obrascima imunofluorescencije među ANA-pozitivnim i među ukupnim ispitanicima prikazan je u Slici 31.



Slika 31. Udio ispitanika s rijetkim obrascem indirektne imunofluorescencije (IIF) među ukupnim ispitanicima i među ispitanicima s dokazanim antinuklearnim protutijelima (ANA).

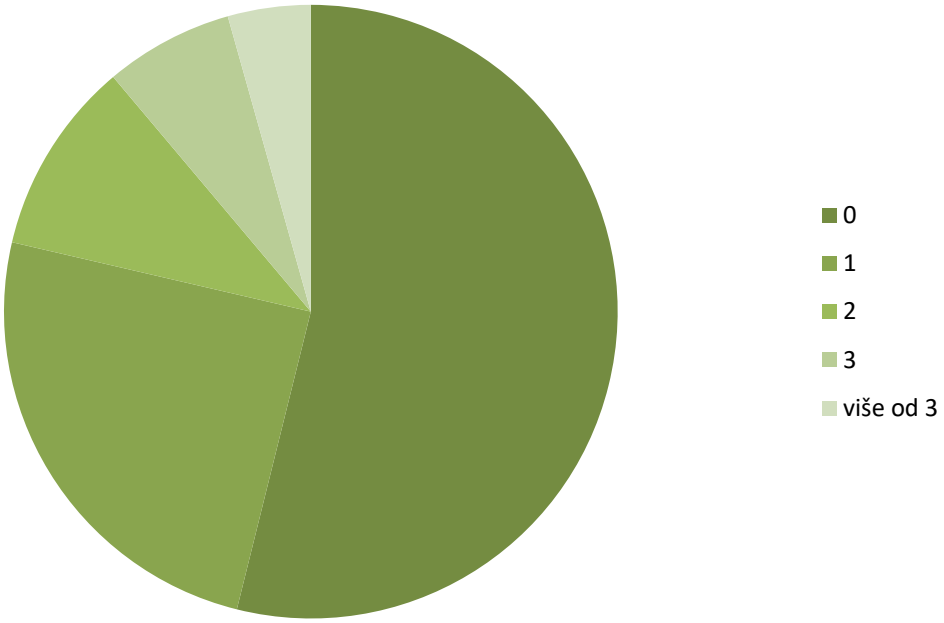
Ispitanici s prisutnim rijetkim obrascima IIF imali su medijan od 54 [IQR 41 – 65] godine. Muškarci (n = 399) su imali medijan dobi od 57 [IQR 41 – 66] godina, dok su žene (n = 1344) imale medijan dobi od 53 [IQR 41 – 64] godine. Ženski su ispitanici bili statistički bitno mlađi (p = 0,027, Mann-Whitneyjev U-test, Slika 32).



Slika 32. Dobna raspodjela muških (m) i ženskih (z) ispitanika s prisutnim rijetkim obrascima imunofluorescencije.

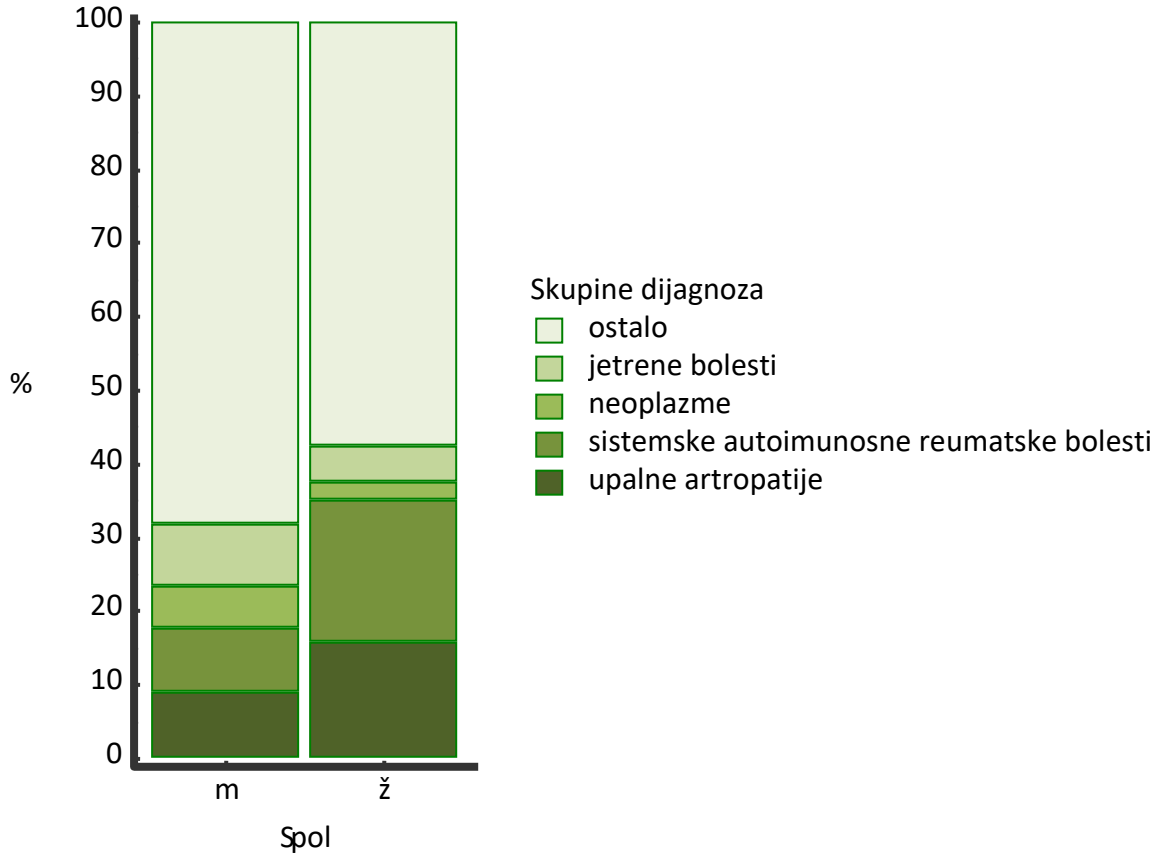
U ispitanika s prisutnim rijetkim obrascima IIF u određenom su broju slučajeva bili istodobno prisutni i neki drugi obrasci IIF. Takva je situacija zamijećena u nešto više od polovice ispitanika (873 uzoraka; 50,08 %), dok je u preostalih ispitanika rijetki obrazac IIF bio jedini prisutan obrazac.

Među ispitanicima s rijetkim obrascima IIF, prisutnost barem jednog od specifičnih autoprotutijela dokazana je u 803 slučaja (46,06 %). U 431 ispitanika (53,67 %) nađeno je jedno specifično protutijelo, u 178 ispitanika (22,16 %) bila su prisutna dva specifična protutijela, tri su protutijela bila prisutna u 118 ispitanika (14,69 %), a u 76 ispitanika (9,46 %) istodobno je nađeno više od tri specifična autoprotutijela (Slika 33).



Slika 33. Broj različitih specifičnih autoprotutijela detektiranih u ispitanika s rijetkim obrascima imunofluorescencije.

Dijagnoza sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti bila je prisutna u 293 bolesnika (16,83 %), a upalne artropatije bile su glavna dijagnoza u 247 (14,18 %) bolesnika. Jetrene su bolesti bile prisutne 99 (5,69 %), a tumorski procesi u 56 bolesnika (3,22 %). Preostalih 1048 ispitanika upućeno je s nekom od dijagnoza koje ne pripadaju u neku od ovih izdvojenih skupina. Raspodjela pojedinih skupina dijagnoza prema spolu ispitanika ($p < 0,0001$) prikazana je u slici 34.

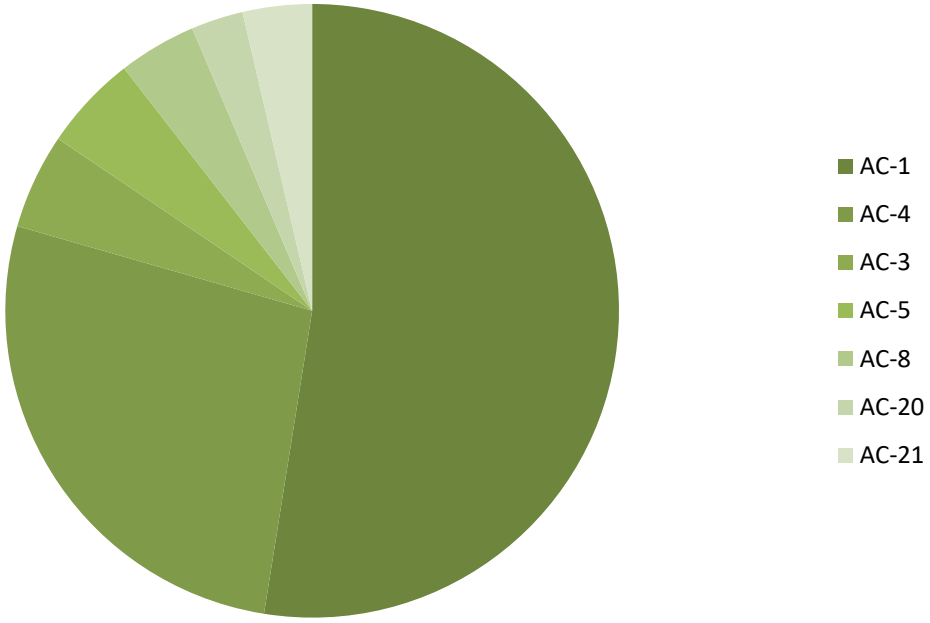


Slika 34. Podjela muških (m) i ženskih (ž) ispitanika prema glavnim skupinama vodećih kliničkih dijagnoza.

Kontrolna skupina

Od 219 ispitanika koji su činili kontrolnu skupinu, 38 je bilo muškaraca, a 181 žena. Medijan njihove dobi bio je 56 [IQR 43 – 67] godina.

Ti su ispitanici imali prisutan neki od učestalih obrazaca IIF, a njihova je zastupljenost prikazana na slici 35.



Slika 35. Raspodjela obrazaca imunofluorescencije u kontrolnoj skupini ispitanika.

Specifična protutijela pronađena su kod 106 ispitanika kontrolne skupine (48,40 %), dok je kod ostalih ispitanika detekcija specifičnih protutijela dala negativan rezultat. Među ispitanicima s pronađenim specifičnim protutijelima, u 63 ispitanika pronađeno je jedno protutijelo, u 24 ispitanika bila su prisutna dva protutijela, u 12 ispitanika tri protutijela, a u preostalih 7 ispitanika detektirano je više od tri specifična protutijela.

Razlike između ispitne i kontrolne skupine po ranije obrađenim kriterijima prikazane su u tablici 2.

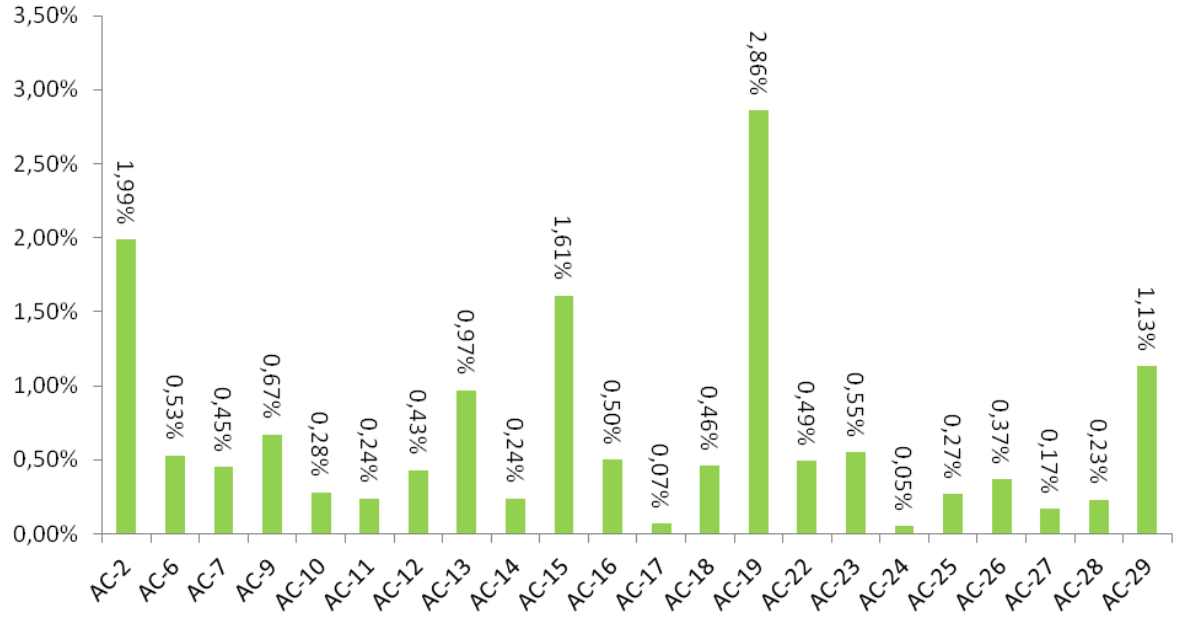
Tablica 2. Razlike između ispitivane i kontrolne skupine

	Ispitivana skupina	**Kontrolna skupina**	**p-vrijednost**
Spol M/Ž	339/1344 (20,14 %/79,86 %)	38/181 (17,35 %/82,65 %)	0,063
Dob (god.)	54 [IQR 41 – 65]	56 [IQR 43 – 67]	0,264
Prisutnost specifičnih protutijela	803/1743 (46,06 %)	106/219 (48,40 %)	0,519
Broj specifičnih protutijela	0,67 ± 0,97	0,69 ± 0,88	0,543
Kliničke dijagnoze			
- *SARD*	293/1743	38/219	0,848
- *upalne artropatije*	247/1743	41/219	0,084
- *jetrene bolesti*	99/1743	5/219	0,036
- *neoplazme*	56/1743	3/219	0,203
- *ostalo*	1048/1743	132/219	0,474

m = muški, ž = ženski, SARD – sistemske autoimunosne reumatske bolesti (prema engl. *systemic autoimmune rheumatic diseases*); vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± SD ili medijan uz interkvartilni raspon u slučaju varijabli, uz korištenje Mann-Whitneyjevog U-testa za usporedbu skupina; dihotomne varijable testirane s pomoću Fisherovog testa.

Raspodjela rijetkih obrazaca imunofluorescencije

Ukupno su 22 obrasca imunofluorescencije zadovoljavala studijski uvjet prema kojima su proglašeni rijetkima ili neuobičajenima, a koji je proizvoljno postavljen na prisutnost u do 3 % svih testiranih uzoraka ispitivane skupine. Raspodjela njihove pojedinačne učestalosti u svim uzorcima prikazana je na slici 36.

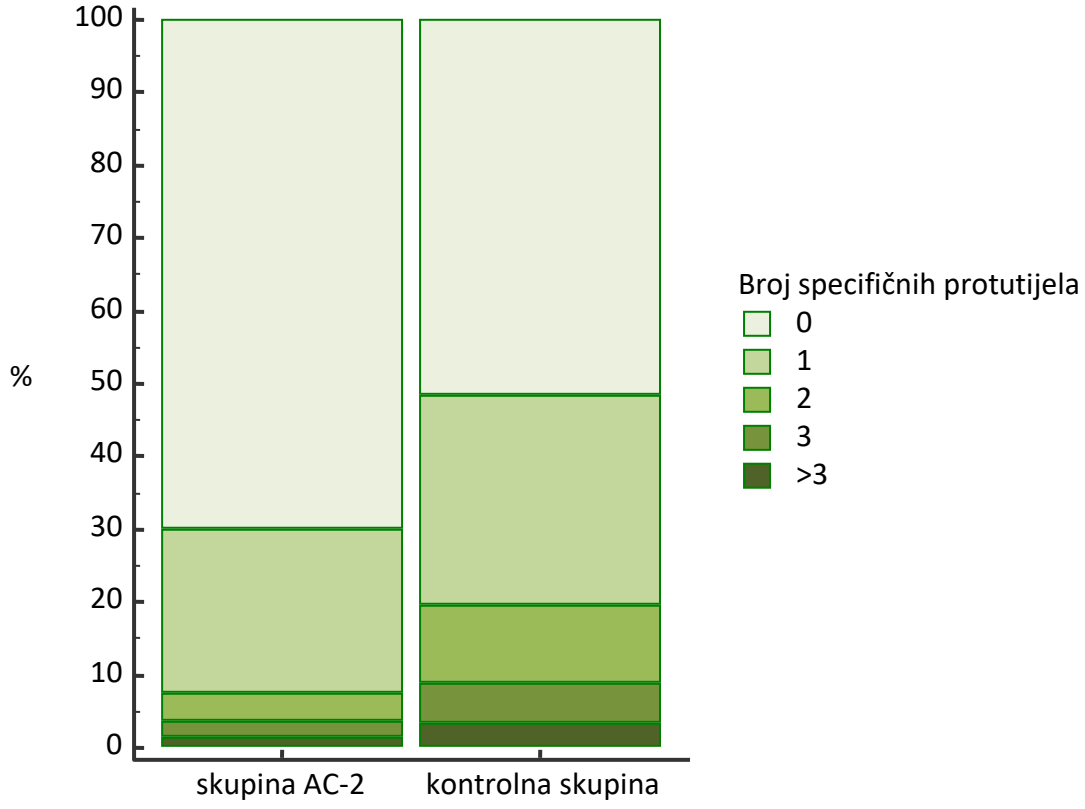


Slika 36. Raspodjela učestalosti prisutnosti pojedinih rijetkih obrazaca imunofluorescencije u svim testiranim uzorcima (N = 10955).

5.2. Obilježja pojedinih rijetkih obrazaca fluorescencije

AC-2

Ovaj je uzorak IIF bio prisutan u 218/4107 uzoraka s dokazanom prisutnošću ANA (5,31 %). Raspodjela ovih ispitanika po spolu (41 muškarac / 177 žena) ne razlikuje se u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,710; Fischerov test). Medijan dobi ispitanika s prisutnim obrascem AC-2 IIF bio je 52 [IQR 37 – 62] godina, što ih čini mlađima od ispitanika u kontrolnoj skupini (p = 0,012; Mann-Whitneyjev U-test). Udio ispitanika s prisutnim specifičnim protutijelima u ovoj skupini iznosio je 31,19 % (68/218 ispitanika), što je znatno manje nego udio njihove prisutnosti u kontrolnoj skupini (p = 0,0003; Fisherov test). Što se tiče broja istodobno prisutnih specifičnih protutijela, najčešće je bilo prisutno samo jedno (49/218 slučajeva), dva su protutijela bila prisutna u 24 slučaja, tri protutijela u 12 slučajeva, a više od tri protutijela u sedam slučajeva, bez razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 37).



Slika 37. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-2 i kontrolne skupine ispitanika.

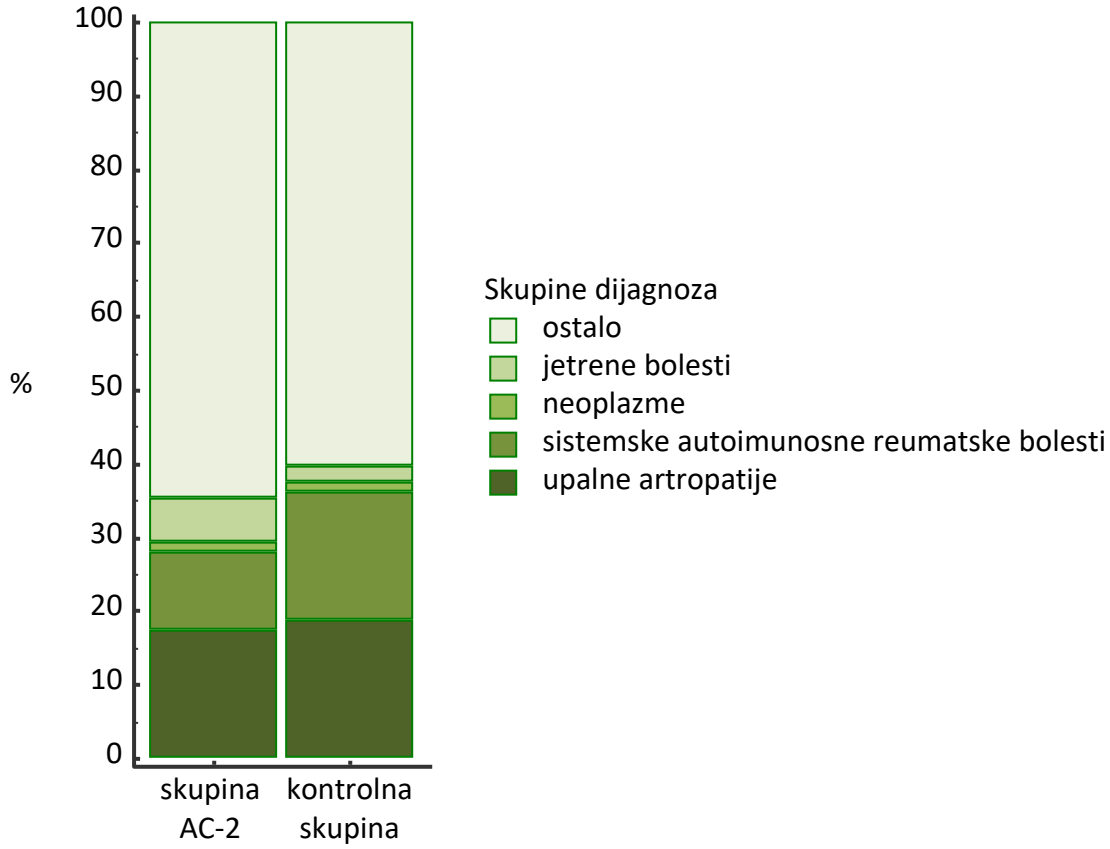
Učestalost prisutnosti pojedinih specifičnih protutijela između ispitanika s ovim obrascem IF i kontrolne skupine prikazana je u tablici 3.

Tablica 3. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-2 i u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-2 (N=218)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	22	32	0,152
anti-SS-A (60kDa)	17	23	0,328
anti-TRIM21	15	31	**0,013**
anti-SS-B	12	16	0,442
anti-Sm	0	1	0,318
anti-U1-RNP	11	16	0,321
anti-Sm/RNP	1	6	0,058
anti-Scl-70	3	6	0,316
anti-Jo1	0	2	0,158
anti-CENP-B	3	12	**0,019**
anti-ribosomi	2	2	0,996
anti-histoni	4	11	0,067
anti-PmScl	6	13	0,103
anti-PCNA	5	17	**0,009**

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

Dijagnoze sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti zabilježene su u 23/218 (10,55 %) ispitanika s obrascem AC-2, a u usporedbi s kontrolnom skupinom vidljiva je tendencija manje učestalosti tih dijagnoza (p = 0,053, Fisherov test). Što se tiče upalnih artropatija, u tih je ispitanika dijagnoza zabilježena s učestalošću od 38/218 (17,43 %), što nije različito od ispitanika u kontrolnoj skupini (p = 0,804; Fisherov test). Neoplazme su bile prisutne u po tri bolesnika ove dvije skupine, dakle također bez znatne razlike (p = 1,00; Fisherov test), a jetrene bolesti u 13 bolesnika s ovim obrascem, pokazujući trend prema većoj učestalosti u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,058; Fisherov test, Slika 38).

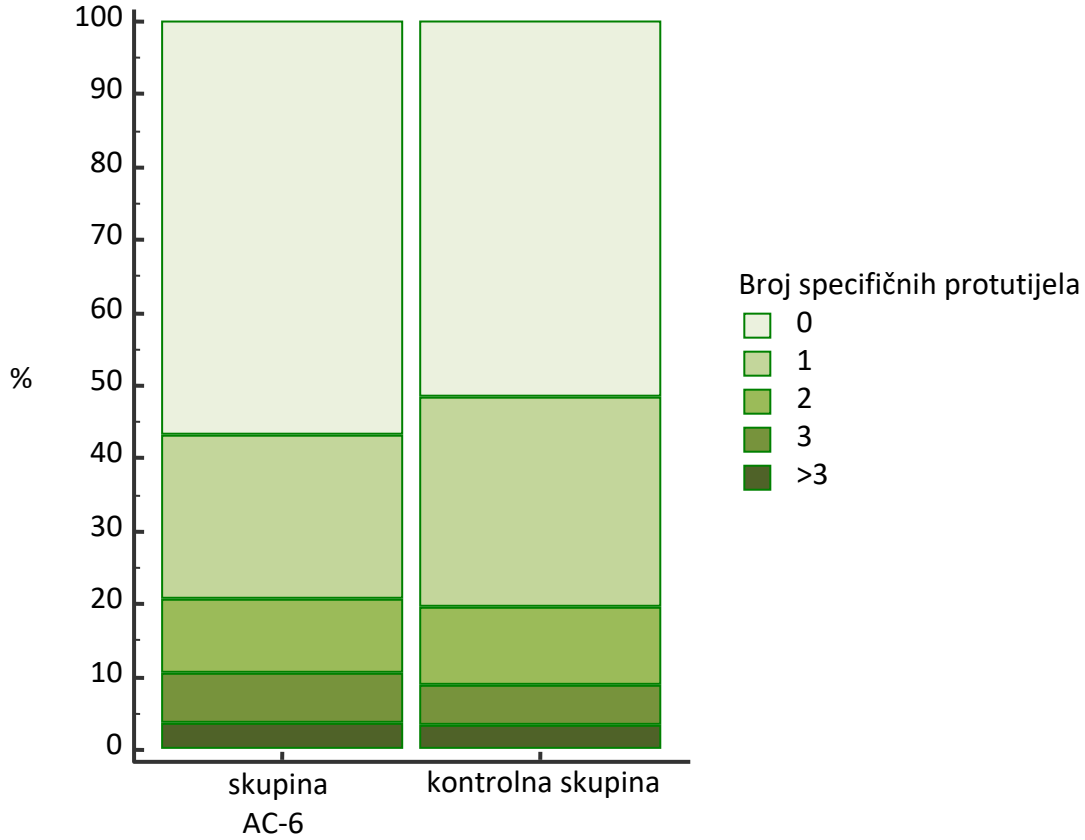


Slika 38. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-2 i u kontrolnoj skupini.

AC-6

Ovaj je obrazac bio zamijećen znatno rjeđe od prethodnog, sveukupno u 58 odnosno 1,41 % ispitanika s dokazanom prisutnošću ANA. Od tih ispitanika samo su četiri bila muškarci (6,89 %), što je manji udio u odnosu na kontrolnu skupinu, ali ne statistički bitno (p = 0,062; Fisherov test). Ovi se ispitanici, s medijanom dobi od 61 [IQR 48 – 66] godinu, ne razlikuju po starosti od kontrolne skupine (p = 0,241; Mann-Whitneyjev U-test). Udio ispitanika s prisutnim specifičnim protutijelima u ovoj skupini iznosio je 46,55 %, što se ne razlikuje bitno od ispitanika u kontrolnoj skupini (p = 0,883; Fisherov test).

Najčešće je u AC-6 uzorku otkriveno samo jedno protutijelo (13 slučajeva, 22,41 %), dva su protutijela bila istodobno prisutna u šest slučajeva (10,34 %), tri u četiri slučaja (6,89 %), a više od tri u dva slučaja (3,45 %), što je slično njihovoj razdiobi u kontrolnoj skupini (p = 0,894; χ^2 test, Slika 39).



Slika 39. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-6 i kontrolne skupine ispitanika.

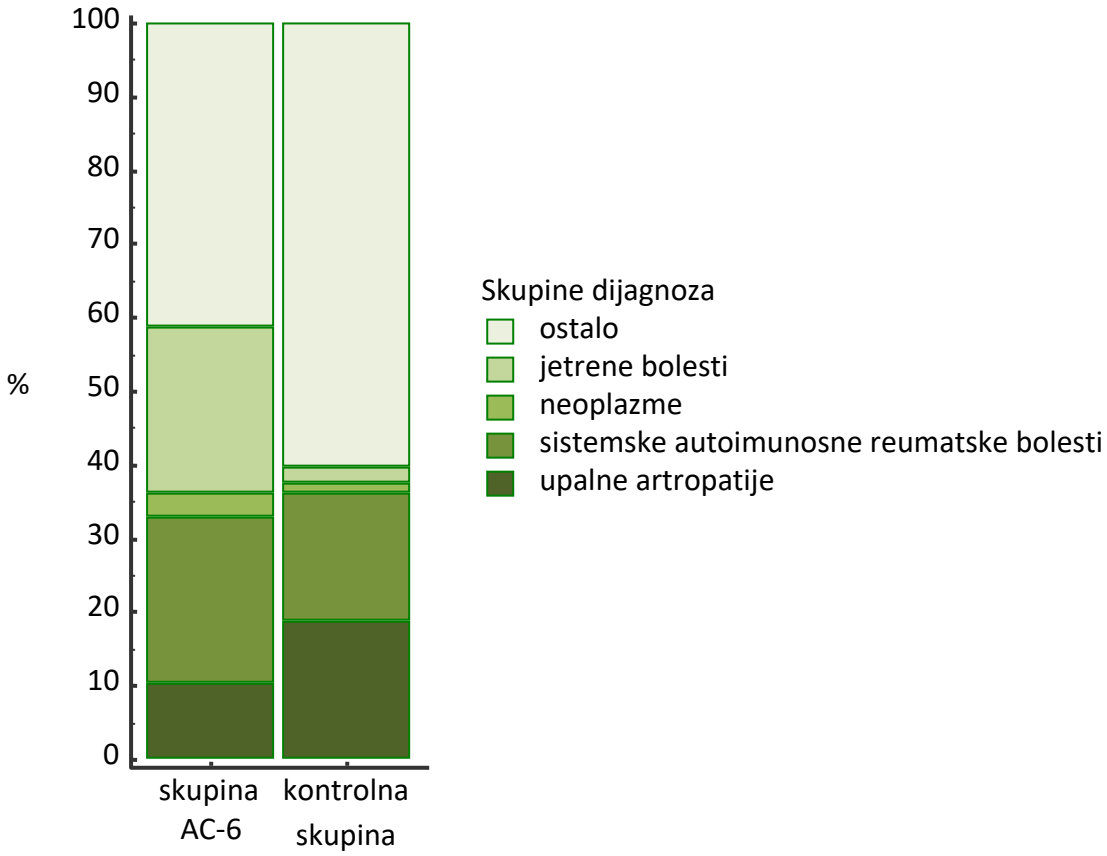
Učestalost prisutnosti pojedinih specifičnih protutijela između ispitanika s ovim obrascem IF i ispitanika kontrolne skupine prikazana je u tablici 4.

Tablica 4. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-6 i u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-6 (N=58)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	12	32	0,261
anti-SS-A (60kDa)	7	23	0,733
anti-TRIM21	13	31	0,127
anti-SS-B	4	16	0,915
anti-Sm	0	1	0,607
anti-U1-RNP	7	16	0,243
anti-Sm/RNP	0	6	0,203
anti-Scl-70	1	6	0,662
anti-Jo1	0	2	0,466
anti-CENP-B	3	12	0,927
anti-ribosomi	0	2	0,466
anti-histoni	1	11	0,273
anti-PmScl	0	13	0,058
anti-PCNA	3	17	0,499

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

Dijagnoza sistemske autoimunosne reumatske bolesti bila je postavljena u 13 bolesnika s AC-6 obrascem, u sličnom postotku kao i u kontrolnoj skupini (p = 0,446; Fisherov test). Upalne su artropatije bile klinička dijagnoza u šest bolesnika (p = 0,168; Fisherov test). Neoplazme također nisu bile prisutne s većom učestalošću (n = 2, p = 0,283; Fisherov test), međutim dijagnoza jetrene bolesti bila je znatno učestalija u ovih bolesnika (n = 13; 22,41 %; p < 0,0001; Fisherov test, Slika 40).

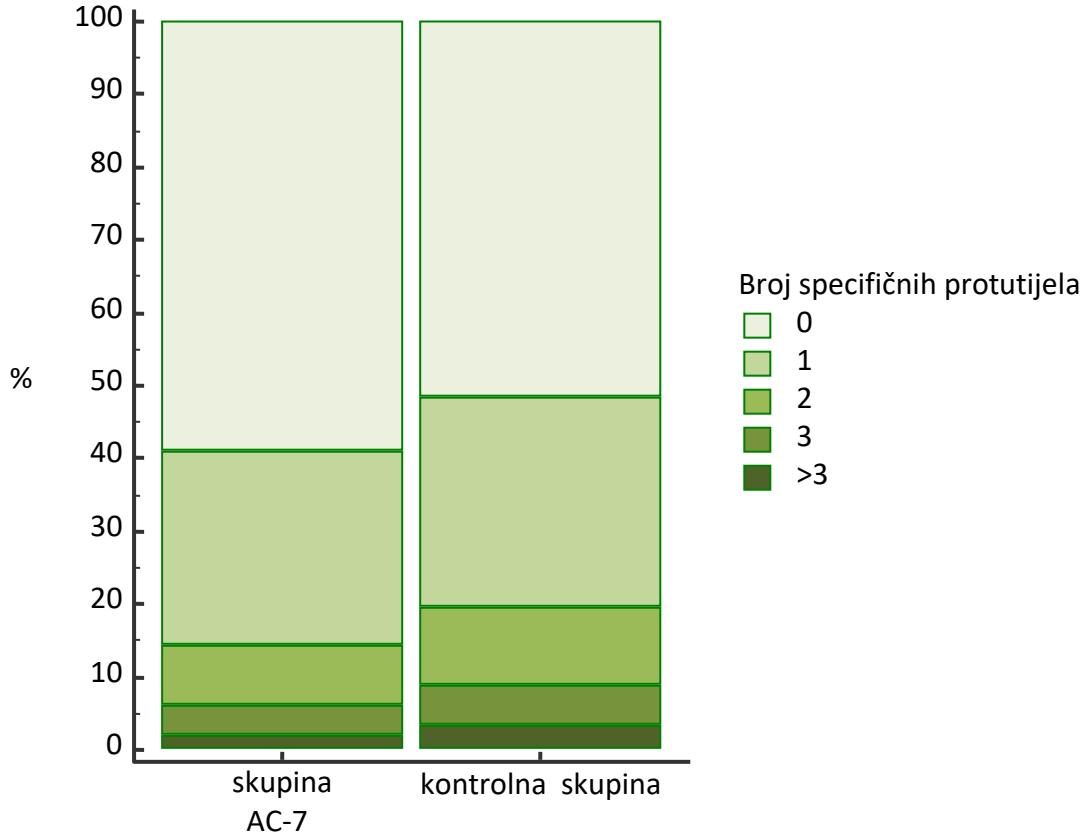


Slika 40. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-6 i u kontrolnoj skupini.

AC-7

Slične učestalosti kao i obrazac AC-6, obrazac AC-7 IF nađen je u 49 ispitanika, što čini 1,19 % od ukupnog broja ANA+ ispitanika. Od tog se broja u četiri slučaja (8,16 %) radilo o muškim, a u 45 slučajeva (91,84 %) o ženskim ispitanicima (p = 0,130 u odnosu na kontrolnu skupinu, Fisherov test). Medijan njihove dobi bio je 43 [IQR 31 – 57,25] godine, što ih čini mnogo mlađima od ispitanika u kontrolnoj skupini (p = 0,0001; Mann-Whitneyjev U-test). U 20 ispitanika (40,81 %) dokazana su specifična protutijela što nije statistički različito od kontrolne skupine (p = 0,348; Fisherov test).

U 13 ispitanika (26,53 %) utvrđena je prisutnost samo jednog protutijela, u četiri (8,16 %) ispitanika bila su istodobno prisutna dva protutijela, u dva ispitanika tri protutijela, a u jednog ispitanika više od tri protutijela, što nije različito od raspodjele u kontrolnoj skupini (p = 0,889; χ^2 test, Slika 41).



Slika 41. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-7 i kontrolne skupine ispitanika.

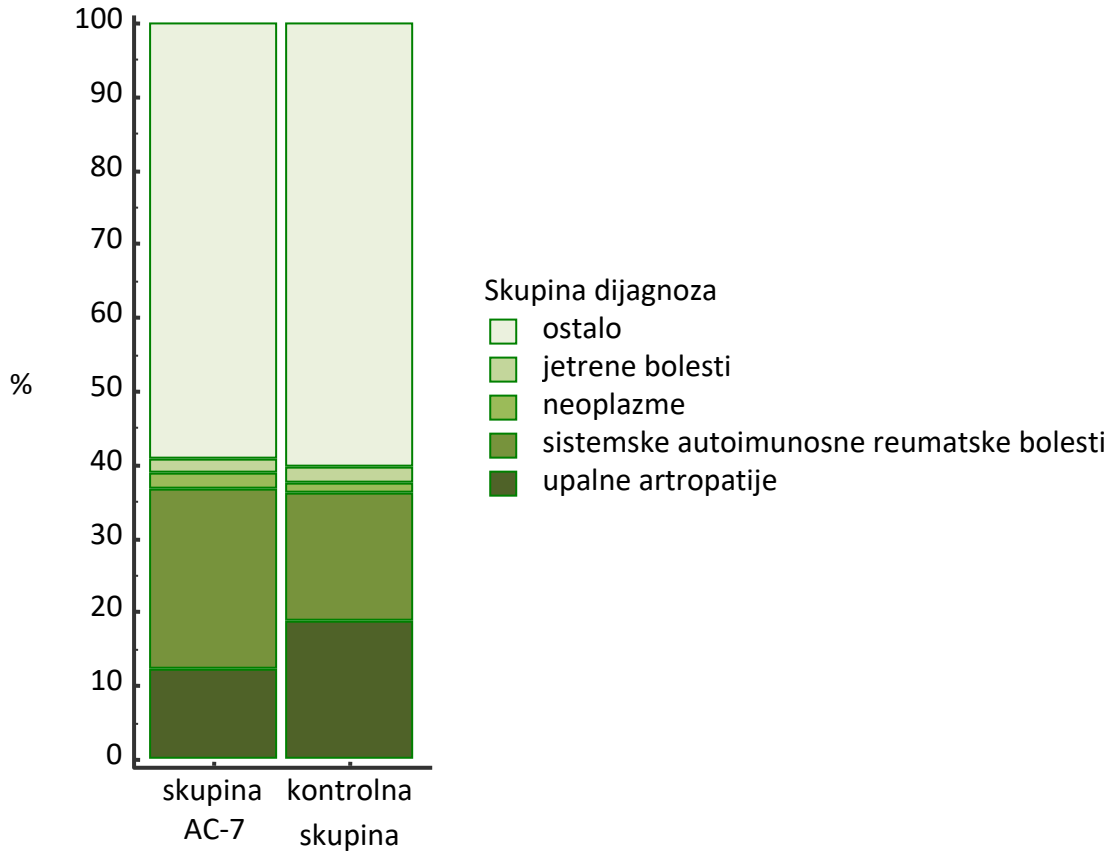
Učestalost prisutnosti pojedinih specifičnih protutijela između ispitanika s ovim obrascem IF i kontrolne skupine prikazana je u tablici 5.

Tablica 5. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-7 i ispitanika u kontrolnoj skupini

Vrst protutijela	Skupina AC-7 (N=49)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	8	32	0,761
anti-SS-A (60kDa)	3	23	0,350
anti-TRIM21	5	31	0,464
anti-SS-B	0	16	0,051
anti-Sm	1	1	0,245
anti-U1-RNP	8	16	**0,046**
anti-Sm/RNP	1	6	0,782
anti-Scl-70	0	6	0,242
anti-Jo1	1	2	0,498
anti-CENP-B	1	12	0,312
anti-ribosomi	0	2	0,503
anti-histoni	1	11	0,362
anti-PmScl	0	13	0,081
anti-PCNA	4	17	0,925

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

U 12 ispitanika s ovim obrascem IF klinička dijagnoza odnosila se na neku od sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti (24,48 %), što nije razlika u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,309, Fisherov test). Upalne artropatije su uputna dijagnoza u šest bolesnika (12,24 %), a neoplazma ili jetrene bolesti u po jednog ispitanika s ovim obrascem (p = 0,405; p = 0,558; p = 1,000 za svaku od ranije navedenih situacija u odnosu na kontrolnu skupinu, Fisherov test; Slika 42).

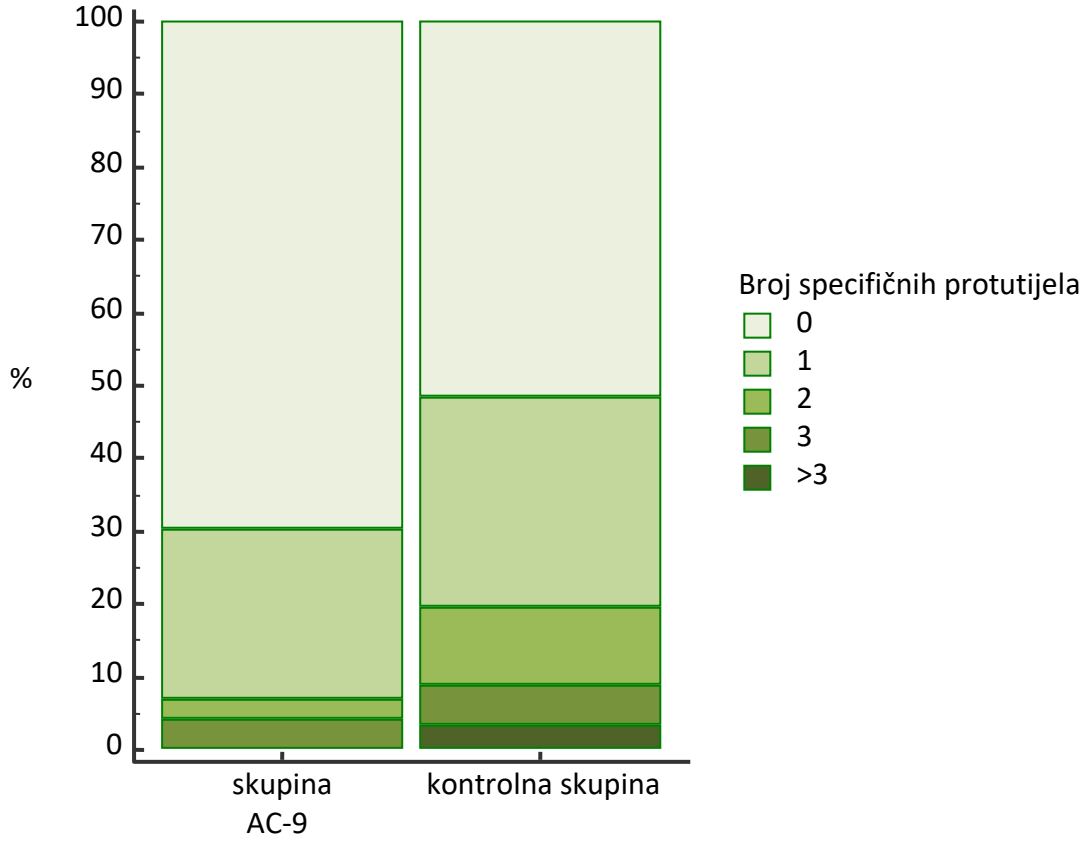


Slika 42. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-7 i u kontrolnoj skupini.

AC-9

Ovaj obrazac IIF uočen je u 68 ispitanika, što je 1,66 % svih ANA-pozitivnih uzoraka. Kod tog obrasca uočava se povišeni udio muških ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu (n = 30; 44,12 %; p = 0,0009; Fisherov test). Medijan dobi ispitanika s ovim obrascem bio je 54 [IQR 37 – 66] godine, što nije različito od ispitanika u kontrolnoj skupini (p = 0,351; Mann-Whitneyjev U-test). Ovi ispitanici imaju dokazana specifična protutijela u 35,29 % slučajeva (n = 24), što je rjeđe u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,021; Fisherov test).

Samo je jedno specifično protutijelo pronađeno u 17 ispitanika (25 %), dva su ispitanika imala dokazana istodobno dva protutijela, tri ispitanika imala su dokazana tri protutijela, dok ispitanika s više od tri istodobno prisutnih protutijela nije nađeno. Raspodjela broja protutijela drugačija je u odnosu na kontrolnu skupinu, s manjim brojem uzoraka u kojima su istodobno prisutna dva protutijela (p = 0,032; χ^2 test; Slika 43).



Slika 43. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-9 i kontrolne skupine ispitanika.

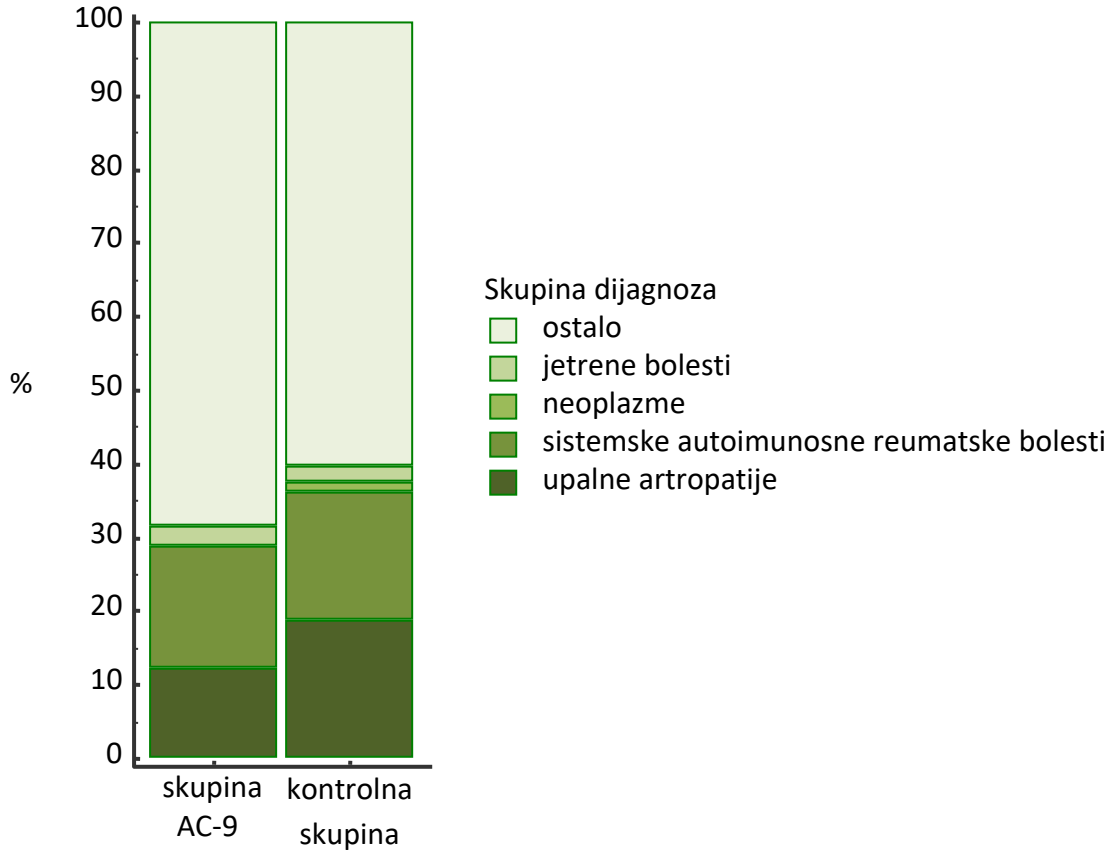
Učestalost pojedinih specifičnih protutijela između ispitanika s ovim obrascem IF i kontrolne skupine prikazana je u tablici 6.

Tablica 6. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-9 i ispitanika u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-9 (N=68)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	8	32	0,433
anti-SS-A (60kDa)	2	23	**0,040**
anti-TRIM21	5	31	0,101
anti-SS-B	3	16	0,338
anti-Sm	0	1	0,564
anti-U1-RNP	4	16	0,593
anti-Sm/RNP	0	6	0,154
anti-Scl-70	0	6	0,154
anti-Jo1	0	2	0,413
anti-CENP-B	0	12	**0,042**
anti-ribosomi	0	2	0,413
anti-histoni	1	11	0,174
anti-PmScl	6	13	0,494
anti-PCNA	2	17	0,133

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

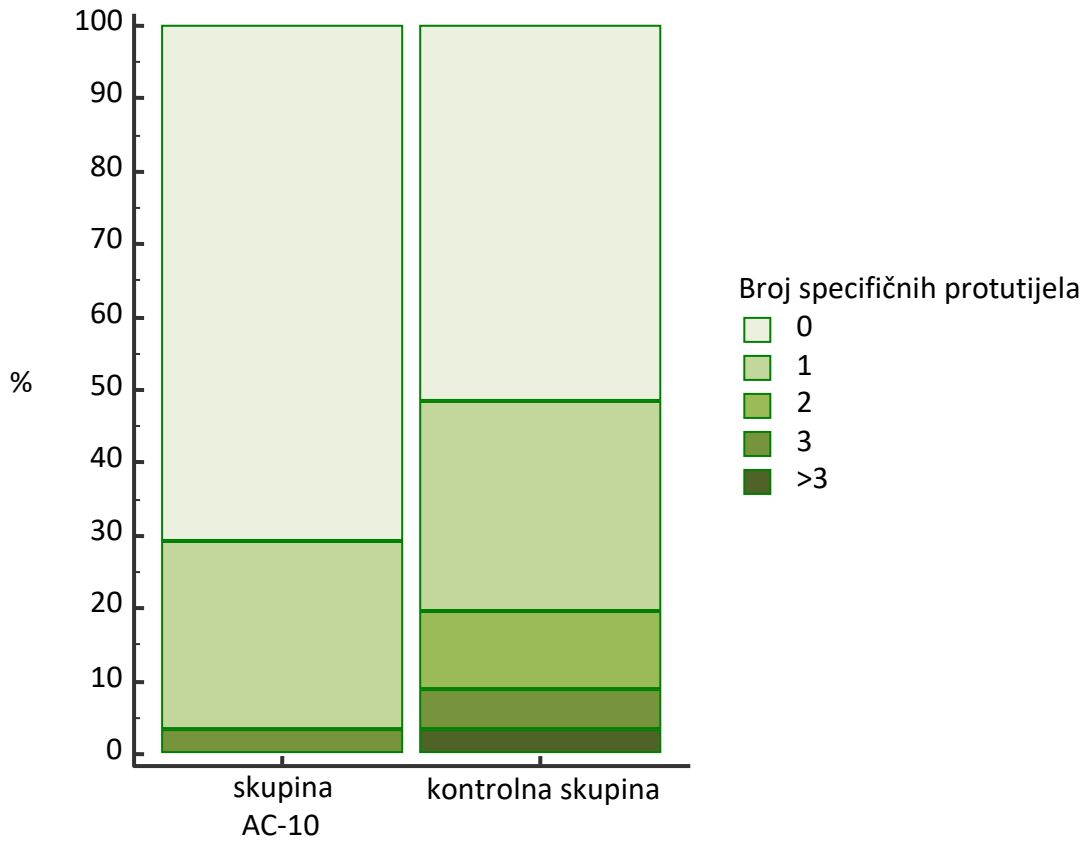
U 12 ispitanika s ovim obrascem IF uputna dijagnoza bila je sistemska autoimunosna reumatska bolest (17,65 %; p = 1,00; Fisherov test), a u šest ispitanika dijagnoza upalne artropatije (p = 0,061; Fisherov test). U dva je ispitanika postavljena dijagnoza jetrene bolesti (p = 0,671; Fisherov test), a niti jedan nije imao dijagnozu tumorske bolesti (p = 1,00; Fisherov test; Slika 44).



Slika 44. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-9 i u kontrolnoj skupini.

AC-10

Ovaj obrazac IF uočen je u 31 ispitanika, što ga čini prisutnim u sveukupno 0,75 % ANA-pozitivnih uzoraka. Od toga broja, 7 (22,58 %) odnosi se na muške, a 24 (77,42 %) na ženske ispitanike (p = 0,460 u odnosu na kontrolnu skupinu; Fisherov test). Njihov medijan dobi bio je 48 [IQR 33,25 – 59] godina, što ih čini mlađima od ispitanika u kontrolnoj skupini (p = 0,007; Mann-Whitneyjev U-test). Ovi ispitanici bili su pozitivni na specifična protutijela u devet slučajeva (29,03 %), što je granično statistički manje od ispitanika u kontrolnoj skupini (p = 0,043; χ^2 test). Kod gotovo svih ispitanika s dokazanim specifičnim protutijelima radilo se samo o jednom istodobno prisutnom protutijelu (osam slučajeva), a kod jednog ispitanika bila su istodobno prisutna tri protutijela. Ova raspodjela ne razlikuje se bitno od one u kontrolnoj skupini (p = 0,157; χ^2 test; Slika 45).



Slika 45. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-10 i kontrolne skupine ispitanika.

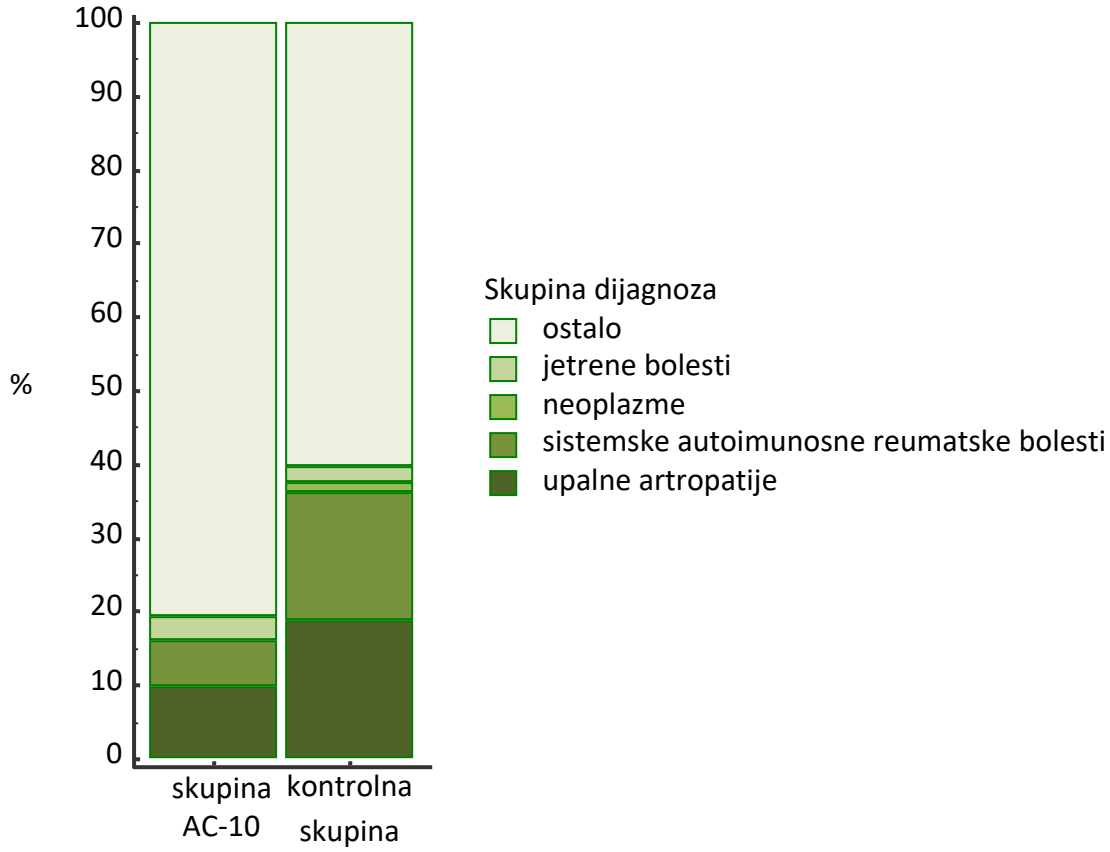
Učestalost prisutnosti pojedinih specifičnih protutijela između ispitanika s ovim obrascem IF i kontrolne skupine prikazana je u tablici 7.

Tablica 7. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-10 i u ispitanika u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-10 (N=31)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	0	32	**0,023**
anti-SS-A (60kDa)	1	23	0,199
anti-TRIM21	3	31	0,497
anti-SS-B	1	16	0,399
anti-Sm	0	1	0,707
anti-U1-RNP	2	16	0,863
anti-Sm/RNP	0	6	0,352
anti-Scl-70	0	6	0,352
anti-Jo1	0	2	0,594
anti-CENP-B	1	12	0,598
anti-ribosomi	0	2	0,594
anti-histoni	1	11	0,662
anti-PmScl	3	13	0,426
anti-PCNA	1	17	0,361

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

Među tim ispitanicima bila su dva ispitanika s uputnom dijagnozom sistemske autoimunosne reumatske bolesti, tri ispitanika s dijagnozom upalne artropatije i jedan ispitanik s dijagnozom jetrene bolesti. U toj skupini nije bilo bolesnika s tumorskim procesom. Statistički se na ovom broju uzoraka ne dokazuje razlika u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0,231$; χ^2 test; Slika 46).

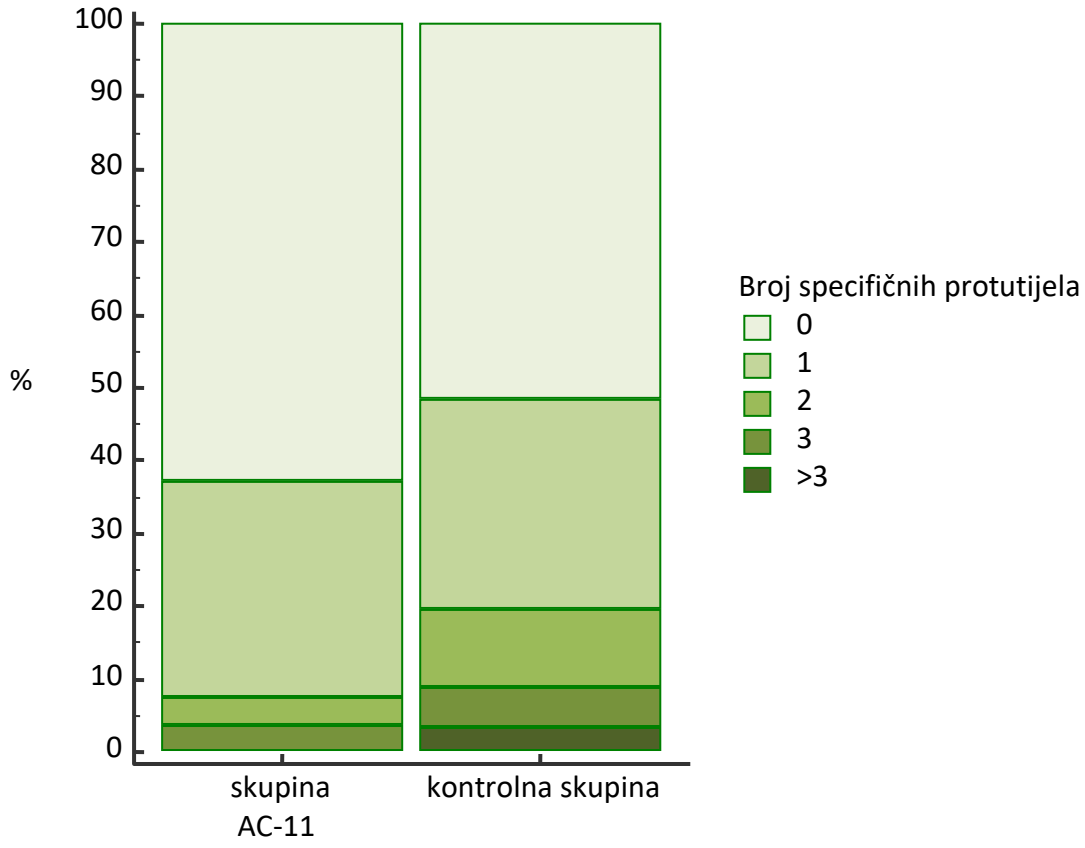


Slika 46. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-10 i u kontrolnoj skupini.

AC-11

Ovaj se obrazac pojavljivao u sličnim proporcijama kao i prethodni, s ukupno 24 ispitanika, odnosno 0,58 % svih ANA-pozitivnih uzoraka. Ovaj je obrazac nađen u 7 (29,16 %) muških i 17 (70,84 %) ženskih ispitanika (p = 0,293 u odnosu na kontrolnu skupinu; Fisherov test), s medijanom dobi od 51 [IQR 38,75 – 63] godinu, bez dokazane razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,137; Mann-Whitneyjev U-test). Specifična su protutijela dokazana u 10 ispitanika (37,03 %), slično kao i u kontrolnoj skupini (p = 0,310; Fisherov test).

U većini (n = 8) slučajeva kod kojih su pronađena specifična protutijela radilo se o jednom protutijelu, a u po jednog ispitanika nađena su istodobno dva ili tri protutijela, što na ovom broju ispitanika nije razlika u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,584; χ^2 test; Slika 24).



Slika 47. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-11 i kontrolne skupine ispitanika.

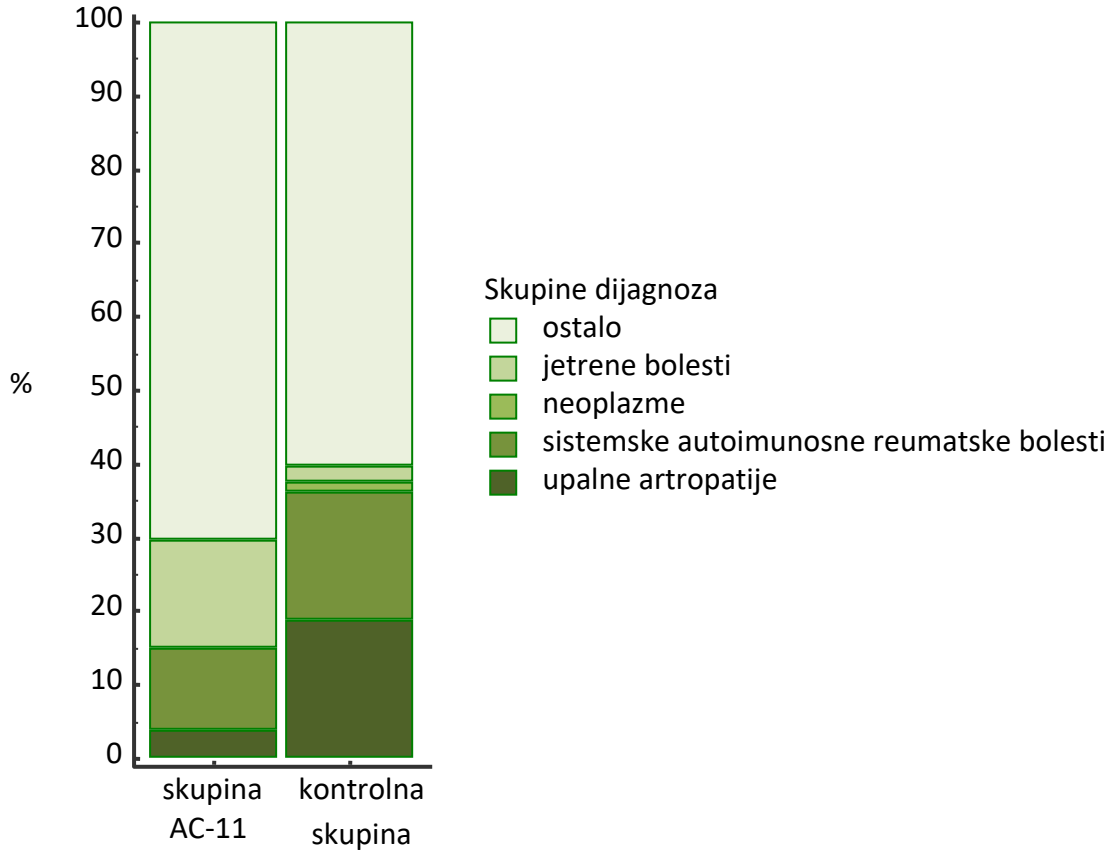
Učestalost pojedinih specifičnih protutijela između ispitanika s ovim obrascem IF i kontrolne skupine prikazana je u Tablici 8.

Tablica 8. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u bolesnika s obrascem imunofluorescencije AC-11 i ispitanika u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-11 (N=27)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	3	32	0,624
anti-SS-A (60kDa)	0	23	0,077
anti-TRIM21	0	31	**0,037**
anti-SS-B	0	16	0,147
anti-Sm	0	1	0,725
anti-U1-RNP	1	16	0,487
anti-Sm/RNP	0	6	0,385
anti-Scl-70	0	6	0,385
anti-Jo1	1	2	0,213
anti-CENP-B	4	12	0,064
anti-ribosomi	0	2	0,612
anti-histoni	1	11	0,764
anti-PmScl	3	13	0,305
anti-PCNA	1	17	0,446

*χ^2 test, vrijednosti <0,05 ispisane su podebljanim brojevima

Među ispitanicima s obrascem AC-11 najčešća je dijagnoza bila ona jetrenih bolesti (n = 4, 14,81 %), što je znatno češće nego u kontrolnoj skupini (p = 0,010; Fisherov test). Dijagnoza upalnih artropatija bila je granično rjeđa (p = 0,057; Fisherov test), dok se ostale dijagnoze ne pojavljuju s različitom učestalošću u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 48).

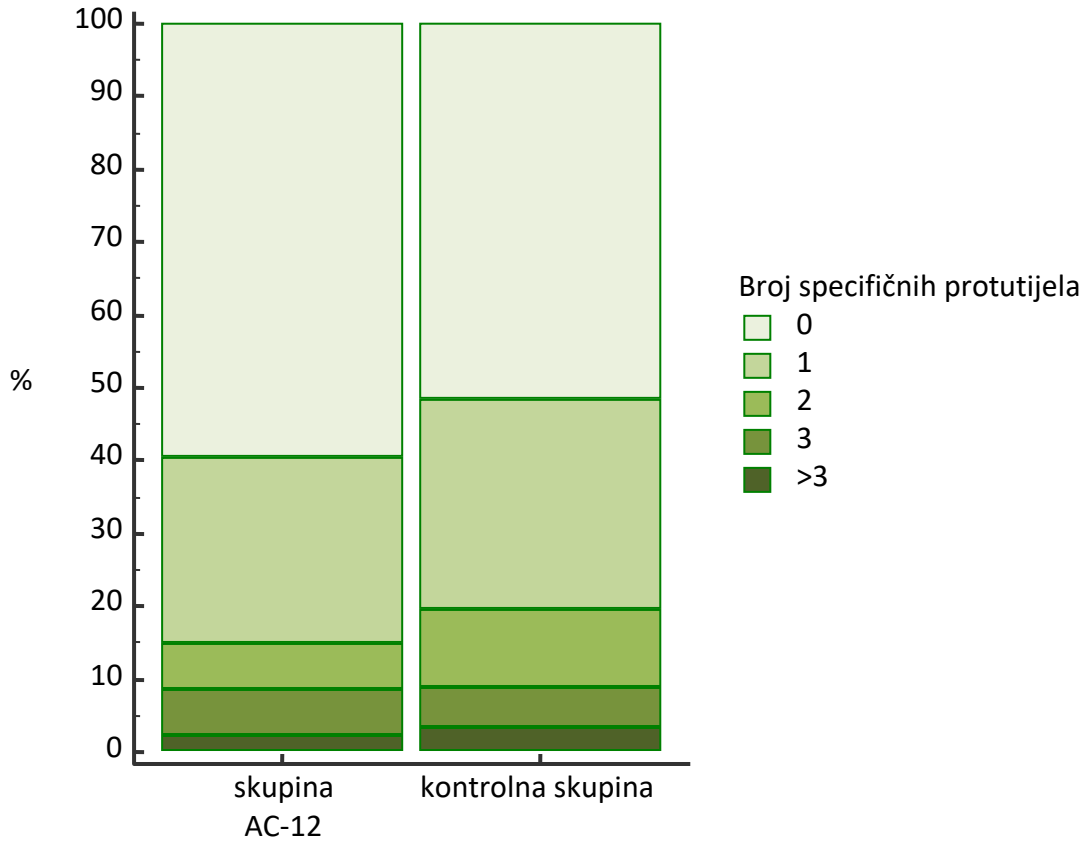


Slika 48. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-11 i u kontrolnoj skupini.

AC-12

Ovaj je obrazac IF zamijećen u 47 ispitanika (1,14 % svih ANA-pozitivnih ispitanika). Od tog je broja bilo 14 muškaraca i 33 žena (p = 0,067 u odnosu na kontrolnu skupinu; Fisherov test). Medijan dobio bio je 58 IQR 52 – 66] godina, bez razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,399; Mann-Whitneyjev U-test). U ovih su ispitanika specifična protutijela nađena u 19 slučajeva (40,42 %), također bez razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,338; Fisherov test).

Najčešće se radilo o nalazu jednog protutijela (n=12, 63,15 %), u po tri ispitanika istodobno je dokazana prisutnost dvaju ili triju protutijela, a u jednog je ispitanika bilo prisutno više od tri protutijela (p = 0,807 u odnosu na kontrolnu skupinu; Slika 49).



Slika 49. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-12 i kontrolne skupine ispitanika.

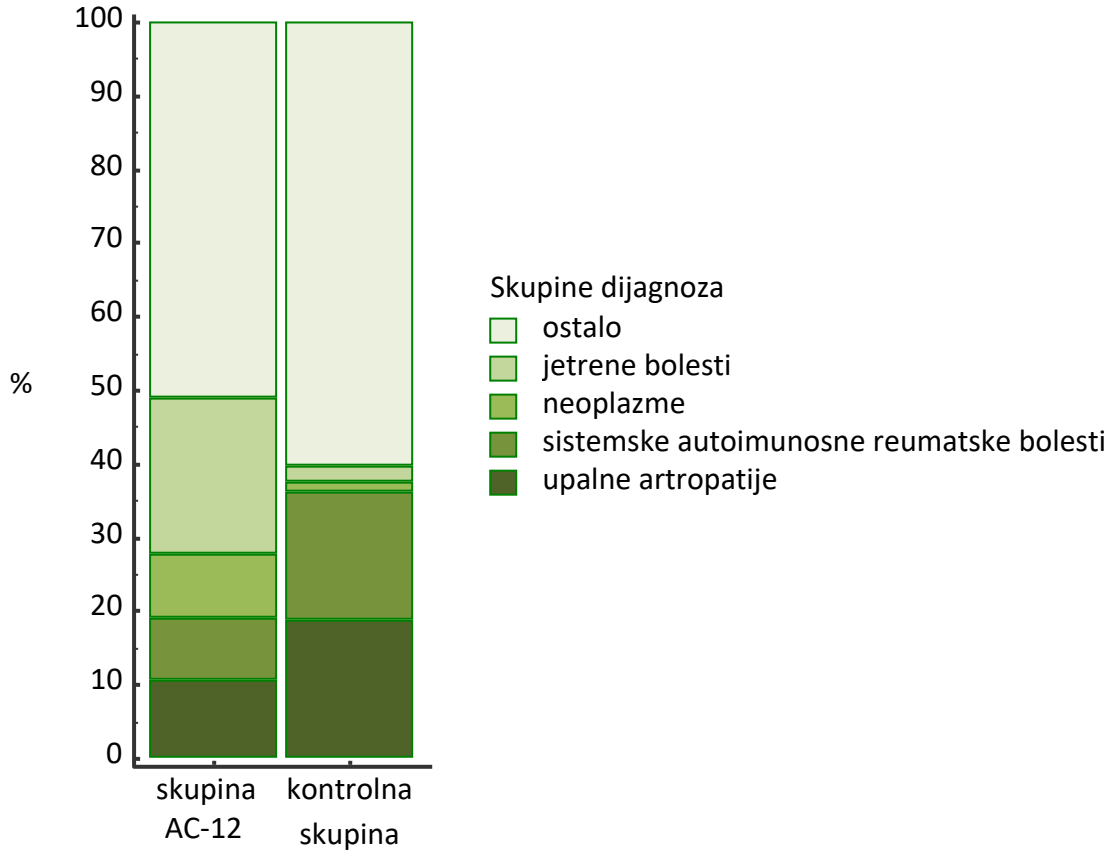
Učestalost prisutnosti pojedinih specifičnih protutijela između ispitanika s ovim obrascem IF i kontrolne skupine prikazana je u tablici 9.

Tablica 9. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-12 i ispitanika u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-12 (N=47)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	7	32	0,960
anti-SS-A (60kDa)	2	23	0,184
anti-TRIM21	7	31	0,895
anti-SS-B	3	16	0,824
anti-Sm	0	1	0,643
anti-U1-RNP	3	16	0,824
anti-Sm/RNP	0	6	0,252
anti-Scl-70	2	6	0,582
anti-Jo1	2	2	0,088
anti-CENP-B	0	12	0,101
anti-ribosomi	0	2	0,512
anti-histoni	2	11	0,825
anti-PmScl	1	13	0,287
anti-PCNA	4	17	0,863

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

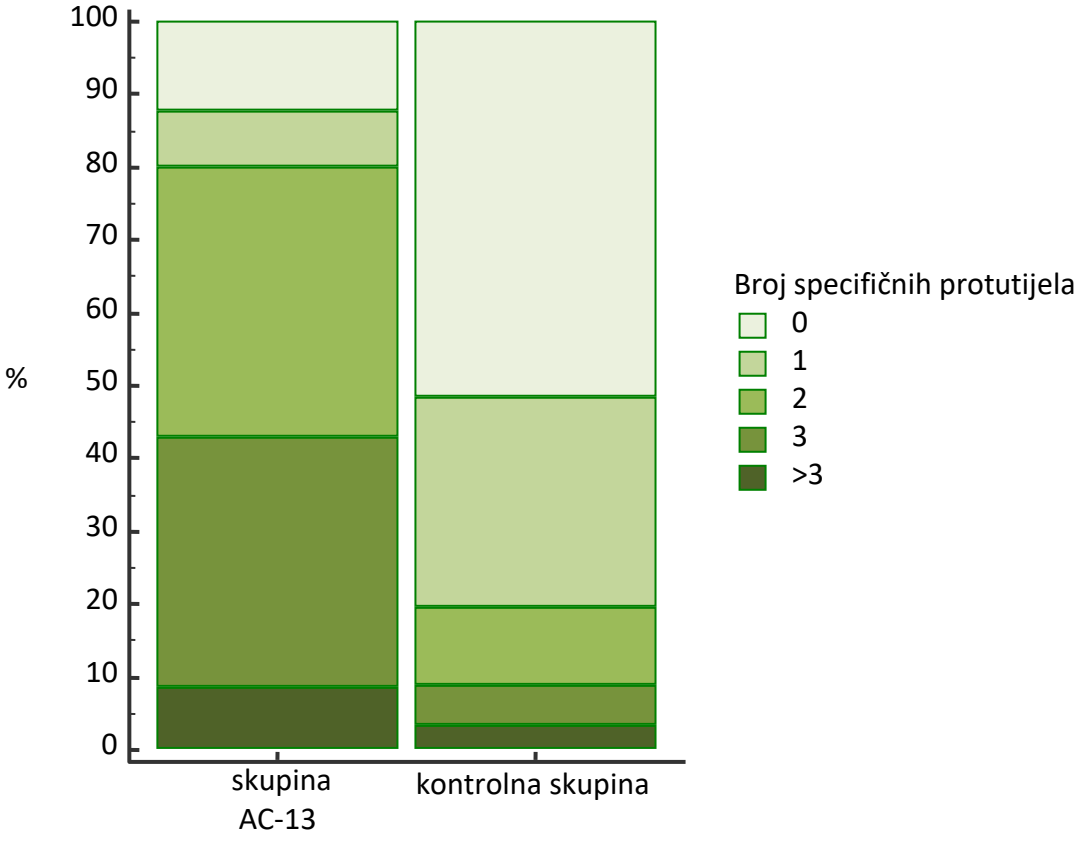
Kao i kod obrasca AC-11, i kod ovog su obrasca učestale uputne dijagnoze bile one jetrenih bolesti (n = 10; 21,27 %; p < 0,0001; Fisherov test). Također su se relativno često pojavljivale i dijagnoze tumora (n = 4; 8,51 %; p = 0,020; Fisherov test), dok su ostale dijagnoze bile u sličnim proporcijama kao u kontrolnoj skupini (Slika 50).



Slika 50. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-12 i u kontrolnoj skupini.

AC-13

Ispitanika s ovim obrascem bilo je znatno više nego u prethodna dva obrasca, a nađen je u 106 ispitanika, odnosno u 2,58 % ANA-pozitivnih ispitanika. Muškarci su bili manje zastupljeni (n = 10; 9,43 %) nego žene (91,57 %). Po ovom kriteriju postoji tendencija razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,067; Fisherov test). Dob je ovih ispitanika imala medijan od 50 [IQR 38 – 62] godina, što ih čini mlađima od ispitanika u kontrolnoj skupini (p = 0,018; Mann-Whitneyjev U-test). Specifična su protutijela kod ovih ispitanika dokazana u čak 93 slučaja (87,73 %), znatno učestalije nego u kontrolnoj skupini (p < 0,0001; Fisherov test). Osim činjenice da su u velikom broju ispitanika nađena specifična protutijela, dodatna je zanimljivost u odnosu na kontrolnu skupinu i velika proporcija ispitanika u kojih je istodobno dokazana prisutnost više protutijela. Tako su dva protutijela istodobno bila prisutna u 39 ispitanika (p < 0,0001; Fisherov test), tri protutijela u 36 ispitanika (p < 0,0001; Fisherov test), a jedno protutijelo u samo osam ispitanika (p < 0,0001; Fisherov test; Slika 51).



Slika 51. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-13 i kontrolne skupine.

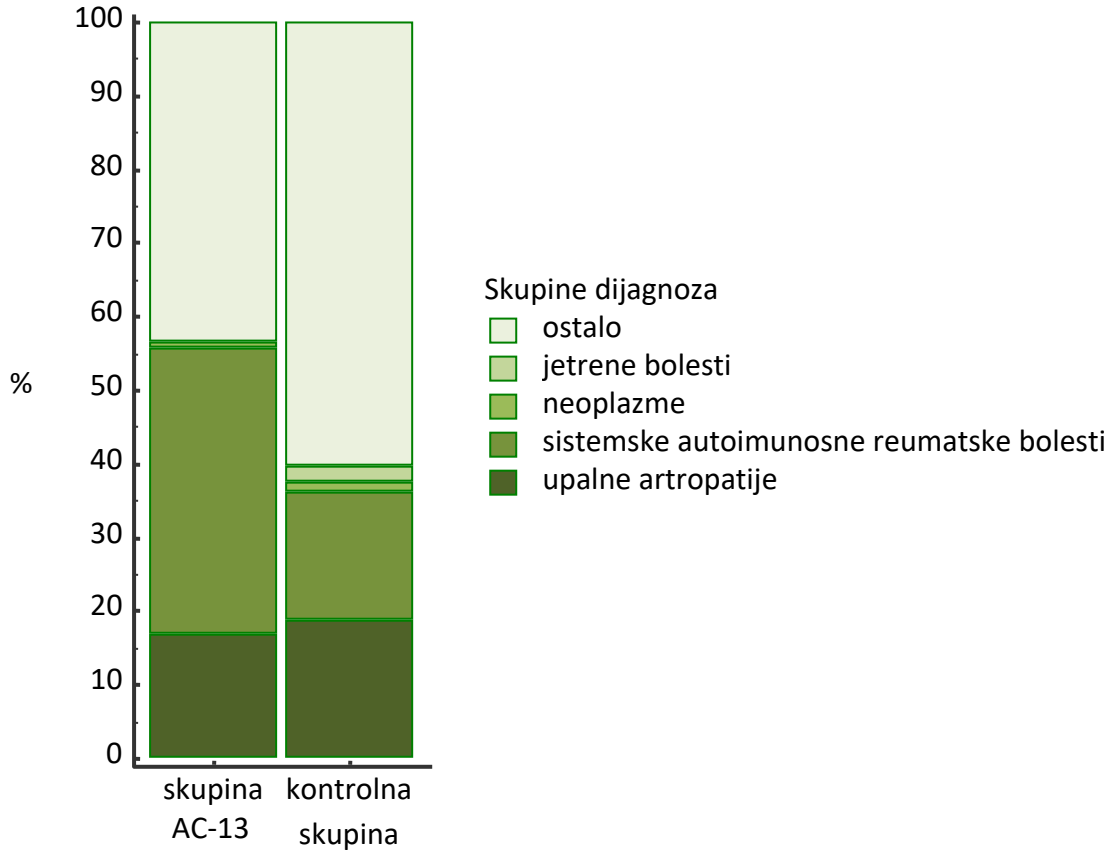
Učestalost prisutnosti pojedinih specifičnih protutijela između ispitanika s ovim obrascem IF i kontrolne skupine prikazana je u tablici 10.

Tablica 10. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-13 i ispitanika u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-13 (N=106)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	21	32	0,235
anti-SS-A (60kDa)	82	23	**< 0,0001**
anti-TRIM21	75	31	**< 0,0001**
anti-SS-B	42	16	**< 0,0001**
anti-Sm	0	1	0,486
anti-U1-RNP	6	16	0,580
anti-Sm/RNP	1	6	0,296
anti-Scl-70	0	6	0,086
anti-Jo1	0	2	0,324
anti-CENP-B	2	12	0,135
anti-ribosomi	1	2	0,978
anti-histoni	2	11	0,177
anti-PmScl	9	13	0,390
anti-PCNA	13	17	0,189

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

Skupina sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti bila je učestalija uputna dijagnoza u ovih ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,0001$; Fisherov test). Ostale su skupine dijagnoza bile prisutne u sličnim proporcijama kao i u kontrolnoj skupini (Slika 52).

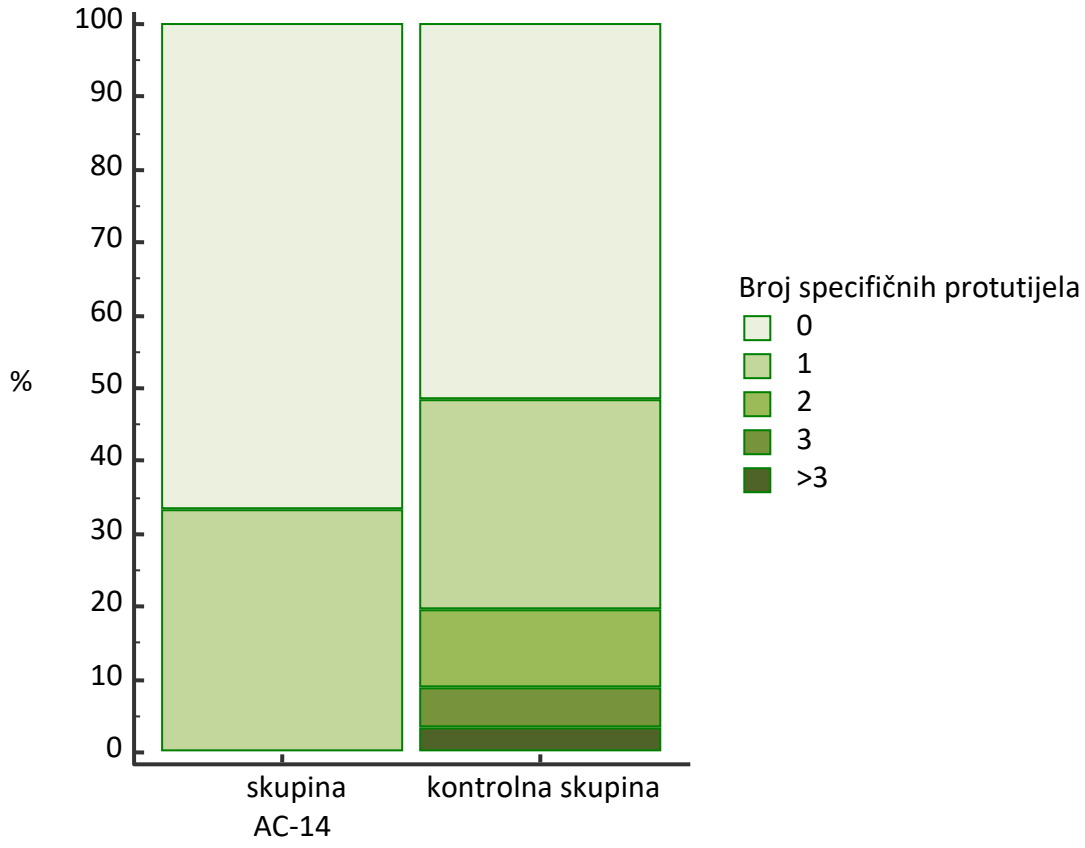


Slika 52. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-13 i u kontrolnoj skupini.

AC-14

Ispitanika s ovim obrascem IF bilo je 27, odnosno 0,65 % od svih ANA-pozitivnih ispitanika. Raspodjela po spolu bila je nalik onoj u kontrolnoj skupini, sa šest muških i 21 ženskim pacijentom (p = 0,594; Fisherov test). Medijan dobi bio je 62 [IQR 51,5 – 64,75] godine, što je više, ali bez dokazane razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,171; Mann-Whitneyjev U-test). U ovih ispitanika specifična su protutijela bila prisutna u 10 slučajeva (37,03 %; p = 0,310).

U svih 10 ispitanika radilo se o samo jednom specifičnom protutijelu, a s obzirom na broj ispitanika bez razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,165; χ^2 test; Slika 53).



Slika 53. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-14 i kontrolne skupine ispitanika.

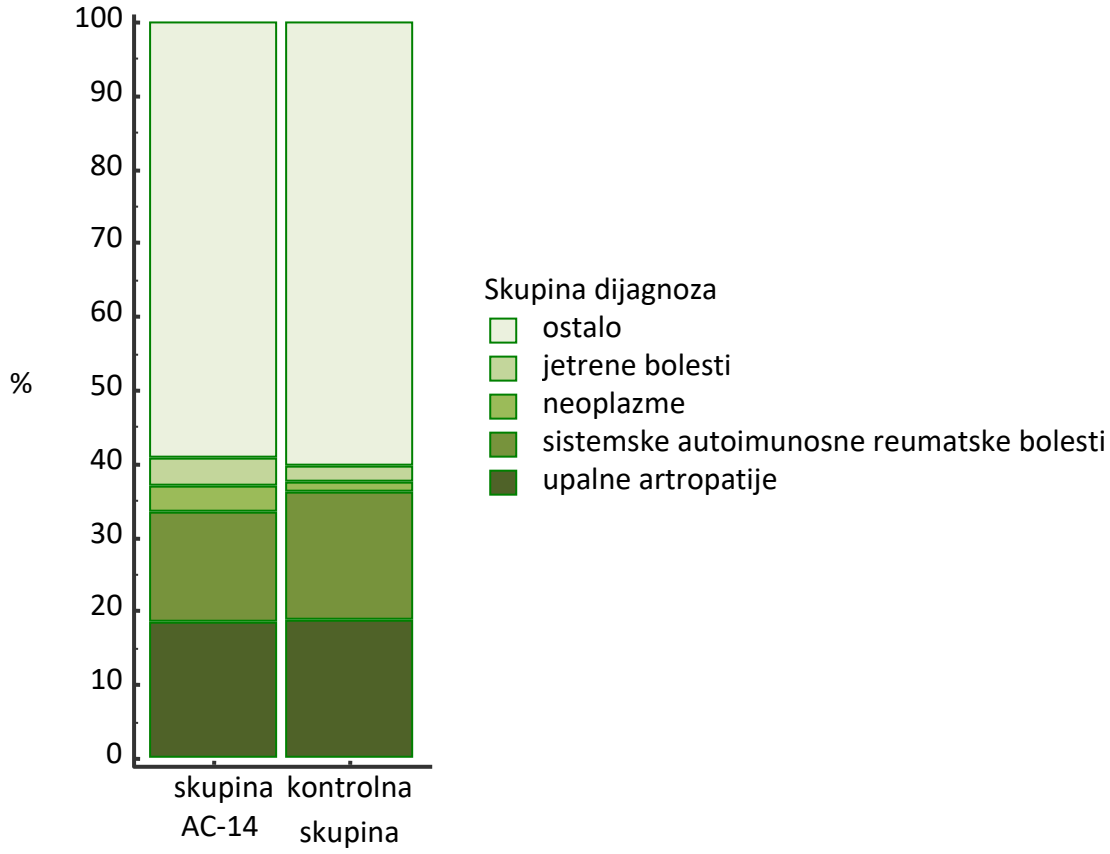
Učestalost prisutnosti pojedinih specifičnih protutijela između ispitanika s ovim obrascem IF i kontrolne skupine prikazana je u tablici 11.

Tablica 11. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-14 i ispitanika u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-14 (N=27)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	3	32	0,624
anti-SS-A (60kDa)	0	23	0,077
anti-TRIM21	2	31	0,333
anti-SS-B	0	16	0,147
anti-Sm	0	1	0,756
anti-U1-RNP	1	16	0,487
anti-Sm/RNP	0	6	0,385
anti-Scl-70	0	6	0,385
anti-Jo1	0	2	0,619
anti-CENP-B	0	12	0,213
anti-ribosomi	0	2	0,619
anti-histoni	2	11	0,602
anti-PmScl	1	13	0,637
anti-PCNA	2	17	0,948

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

Prisutnost određenih skupina uputnih dijagnoza nije se razlikovala od kontrolne skupine, s pet ispitanika s dijagnozom upalne artropatije, četiri ispitanika s dijagnozom sistemske autoimunosne reumatske bolesti te s po jednim ispitanikom s dijagnozom tumorske ili jetrene bolesti ($p = 0,894$; χ^2 test; Slika 54).

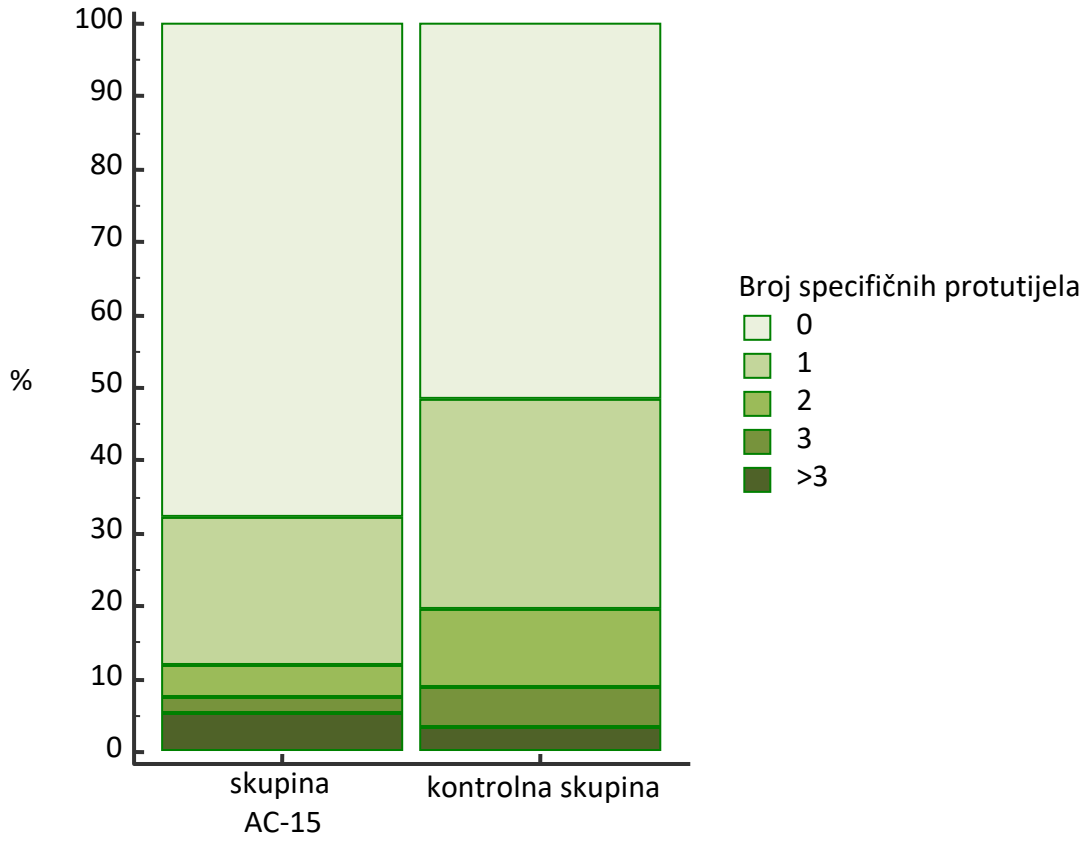


Slika 54. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-14 i u kontrolnoj skupini.

AC-15

Ovaj je obrazac IF uočavan relativno učestalo, u 177 ispitanika, odnosno 4,30 % svih ANA-pozitivnih ispitanika. Ispitanici s ovim obrascem znatno su učestalije bili muškog spola (n = 53; 29,94 %; p = 0,004 u odnosu na kontrolnu skupinu; Fisherov test). Dob im je bila slična onoj u kontrolnoj skupini, s medijanom od 53 [IQR 38 – 64,25] godine (p = 0,187; Mann-Whitneyjev U-test). Prema nalazu specifičnih protutijela, ona su dokazana u 60 ispitanika (33,89 %), što je manje učestalo nego u kontrolnoj skupini (p = 0,004; Fisherov test).

U ovih je ispitanika bio nešto veći udio onih s istodobnom prisutnosti više od triju specifičnih protutijela (n = 9; p = 0,095). Preostali ispitanici nisu se od kontrolne skupine razlikovali po broju istodobno prisutnih vrsta protutijela (Slika 55).



Slika 55. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-15 i kontrolne skupine ispitanika.

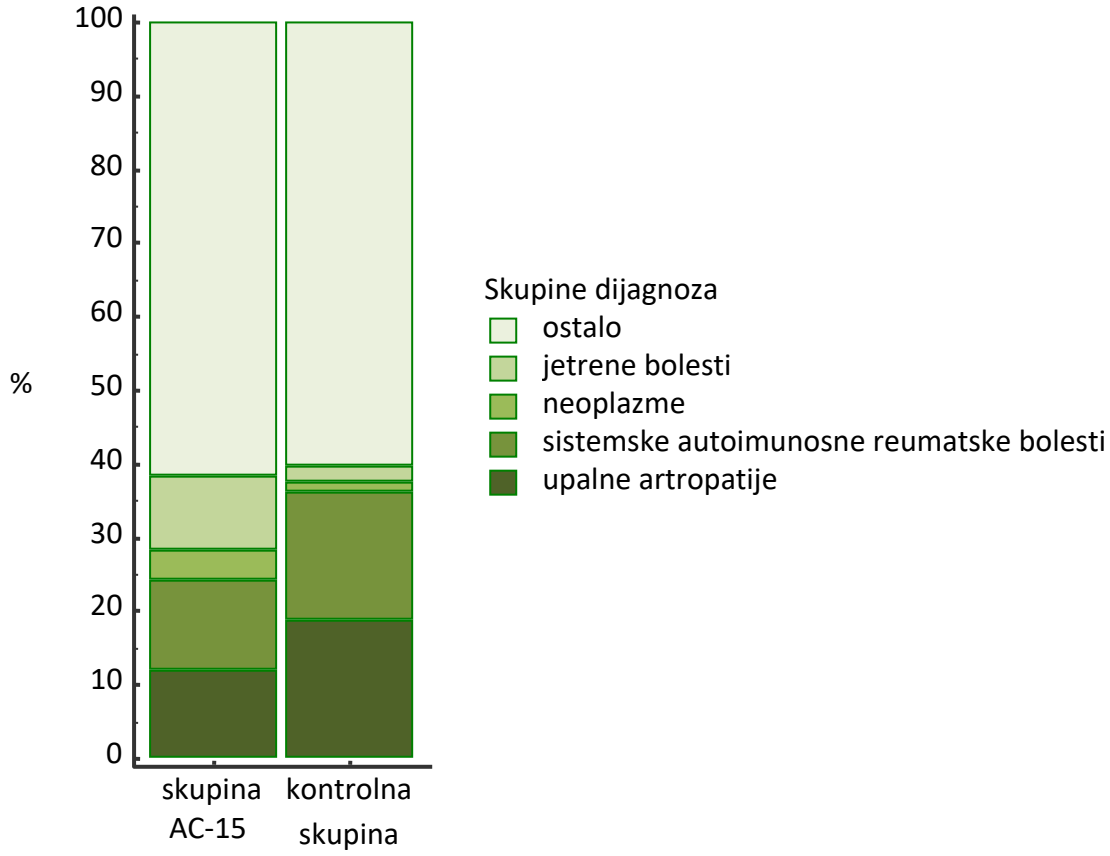
Učestalost prisutnosti pojedinih specifičnih protutijela između ispitanika s ovim obrascem IF i kontrolne skupine prikazana je u tablici 12.

Tablica 12. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-15 i ispitanika u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-15 (N=177)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	20	32	0,333
anti-SS-A (60kDa)	9	23	**0,049**
anti-TRIM21	13	31	**0,032**
anti-SS-B	11	16	0,669
anti-Sm	0	1	0,387
anti-U1-RNP	19	16	0,233
anti-Sm/RNP	1	6	0,103
anti-Scl-70	3	6	0,489
anti-Jo1	4	2	0,276
anti-CENP-B	2	12	**0,019**
anti-ribosomi	3	2	0,489
anti-histoni	6	11	0,426
anti-PmScl	8	13	0,532
anti-PCNA	8	17	0,188

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

Skupine dijagnoza sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti (n = 22) i upalnih artropatija (n = 21) prisutne su u sličnim proporcijama kao i u kontrolnoj skupini, nešto je više ispitanika s dijagnozom tumora (n = 7; p = 0,119; Fisherov test), dok je znatno više ispitanika s dijagnozom jetrenih bolesti (n = 18; p = 0,001; Fisherov test; Slika 56).

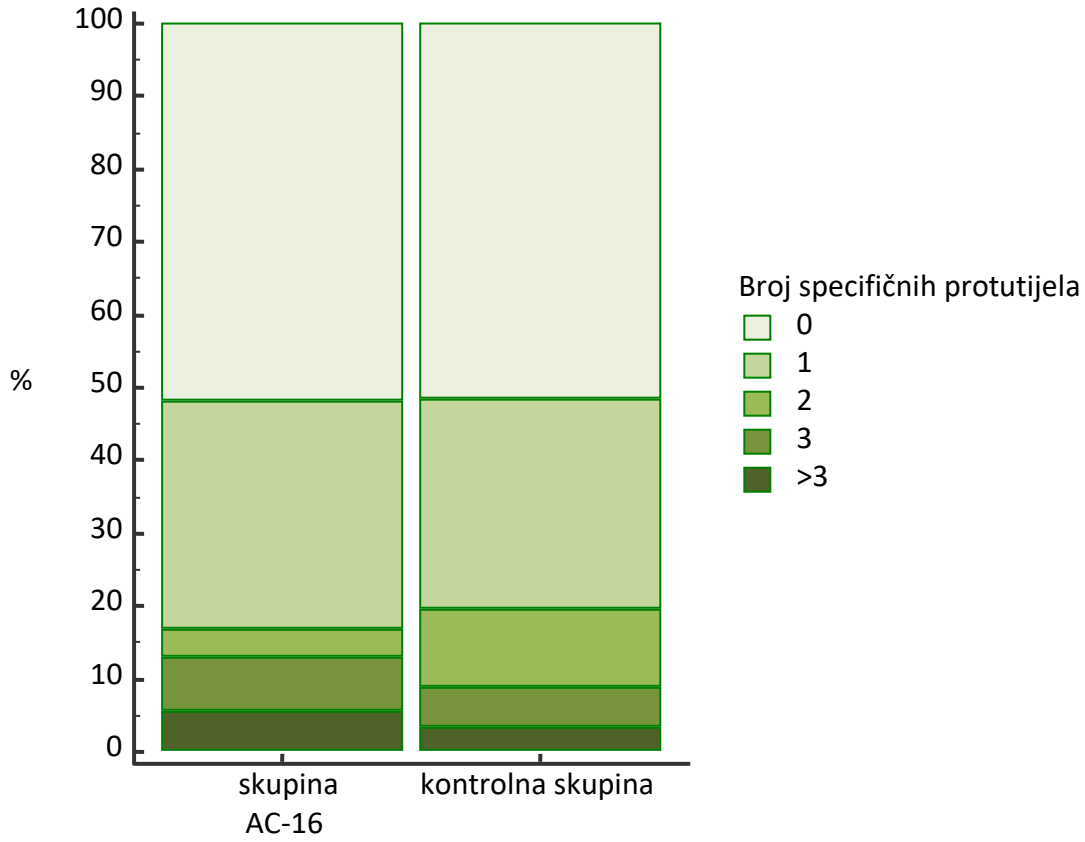


Slika 56. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-15 i u kontrolnoj skupini.

AC-16

Kod ovog obrasca, koji je uočen u 55 ispitanika, odnosno 1,34 % svih ANA pozitivnih ispitanika, znatno je više muškaraca (n = 24, 43,63 %) u odnosu na kontrolnu skupinu, dok se u 31 slučaju radilo o ženama (56,37 %; p = 0,001; Fisherov test). Medijan dobi im je 55 [IQR 46 – 67,75] godina, što se ne razlikuje od dobi ispitanika u kontrolnoj skupini (p = 0,853; Mann-Whitneyjev U-test). Specifična su protutijela dokazana u 26 ispitanika, što je slično proporciji u kontrolnoj skupini (p = 1,00; Fisherov test).

U ispitanika s dokazanim specifičnim protutijelima najčešće se radilo o jednom protutijelu (17 slučajeva, 65,38 %), dok se u manjem broju slučajeva radilo o više istodobno prisutnih protutijela, i to dva protutijela u dva slučaja, tri protutijela u četiri slučaja, i više od tri protutijela u tri slučaja. Ovakva raspodjela nije različita u odnosu na raspodjelu u kontrolnoj skupini (p = 0,487; χ^2 test; Slika 57).



Slika 57. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-16 i kontrolne skupine ispitanika.

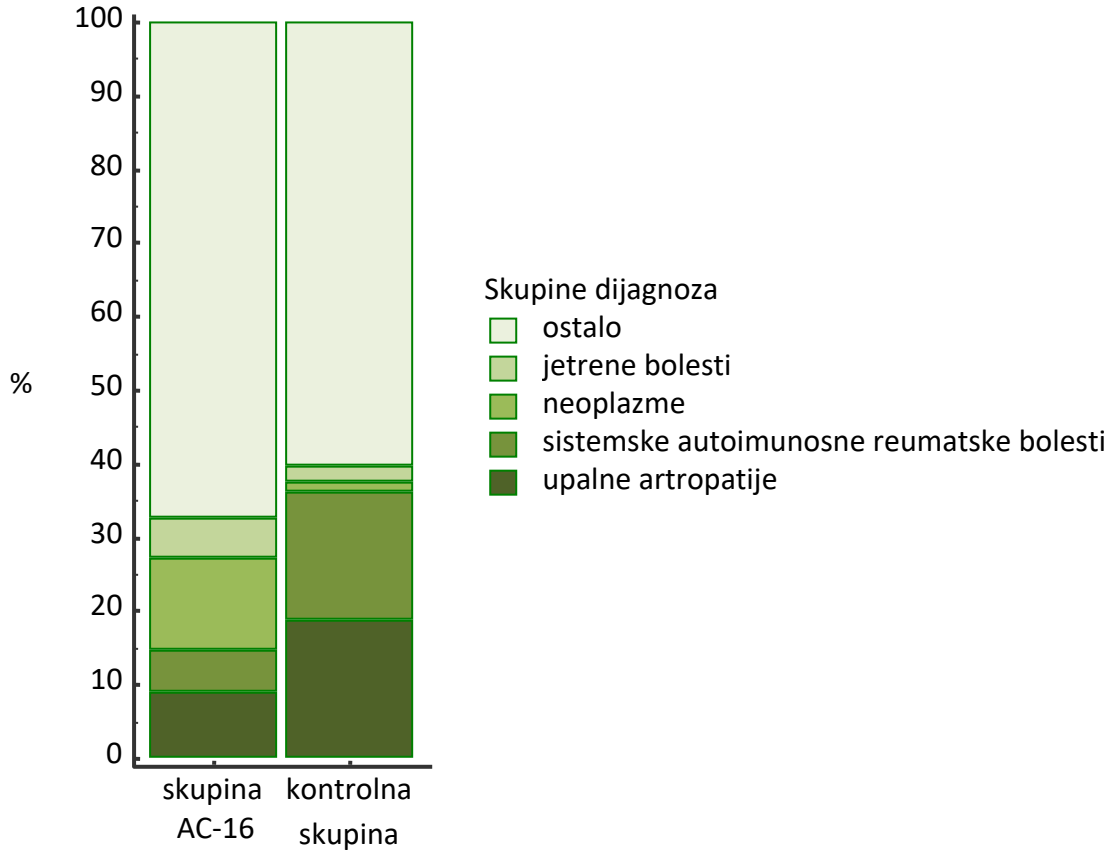
Učestalost prisutnosti pojedinih specifičnih protutijela između ispitanika s ovim obrascem IF i kontrolne skupine prikazana je u tablici 13.

Tablica 13. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-16 i ispitanika u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-16 (N=55)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	9	32	0,745
anti-SS-A (60kDa)	6	23	0,930
anti-TRIM21	8	31	0,941
anti-SS-B	3	16	0,629
anti-Sm	0	1	0,616
anti-U1-RNP	5	16	0,657
anti-Sm/RNP	2	6	0,724
anti-Scl-70	1	6	0,699
anti-Jo1	1	2	0,565
anti-CENP-B	1	12	0,254
anti-ribosomi	2	2	0,133
anti-histoni	2	11	0,666
anti-PmScl	5	13	0,399
anti-PCNA	3	17	0,557

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

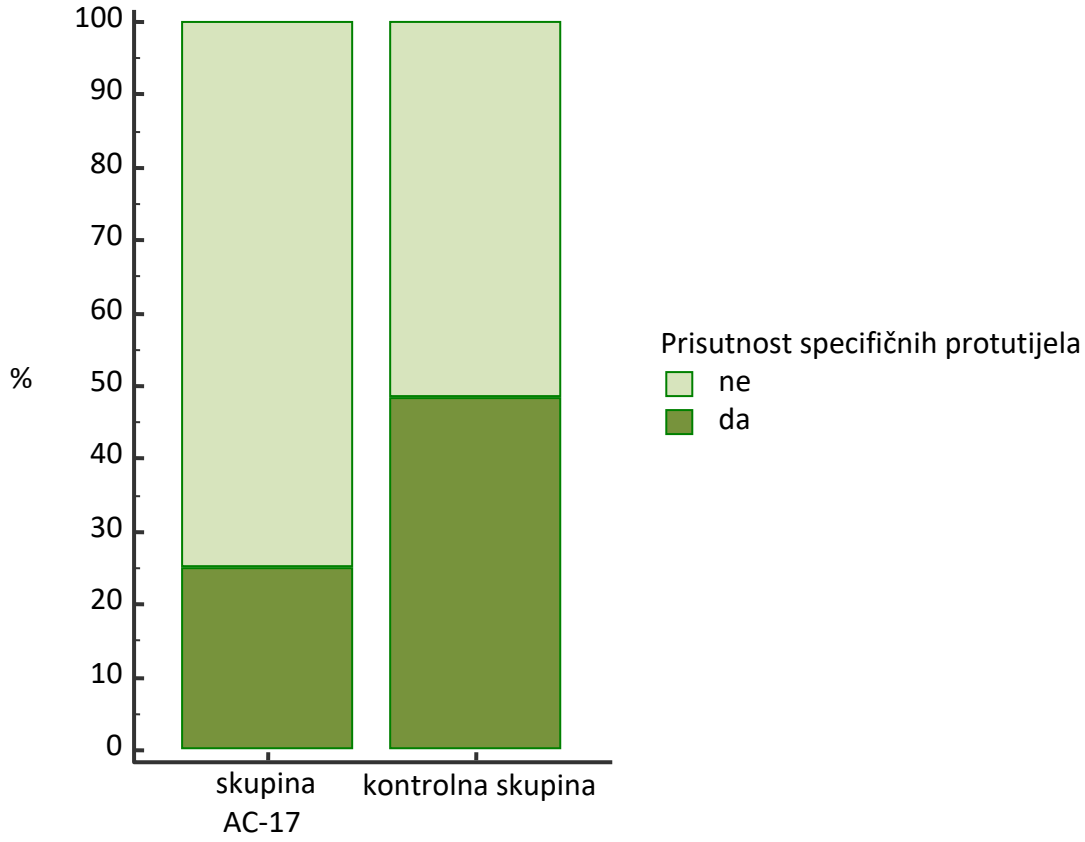
Kod ovih su ispitanika dijagnoze iz skupine sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti (n = 3), kao i upalnih artropatija (n = 5), uočene u sličnim proporcijama kao u kontrolnoj skupini, ali je zamijećen znatno veći udio ispitanika s dijagnozom tumorskog procesa (n = 7; 12,72 %; p = 0,0007; Fisherov test; Slika 58). Dijagnoza povezanih s jetrenim bolestima nije bilo u različitoj proporciji u odnosu na kontrolnu skupinu.



Slika 58. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-16 i u kontrolnoj skupini.

AC-17

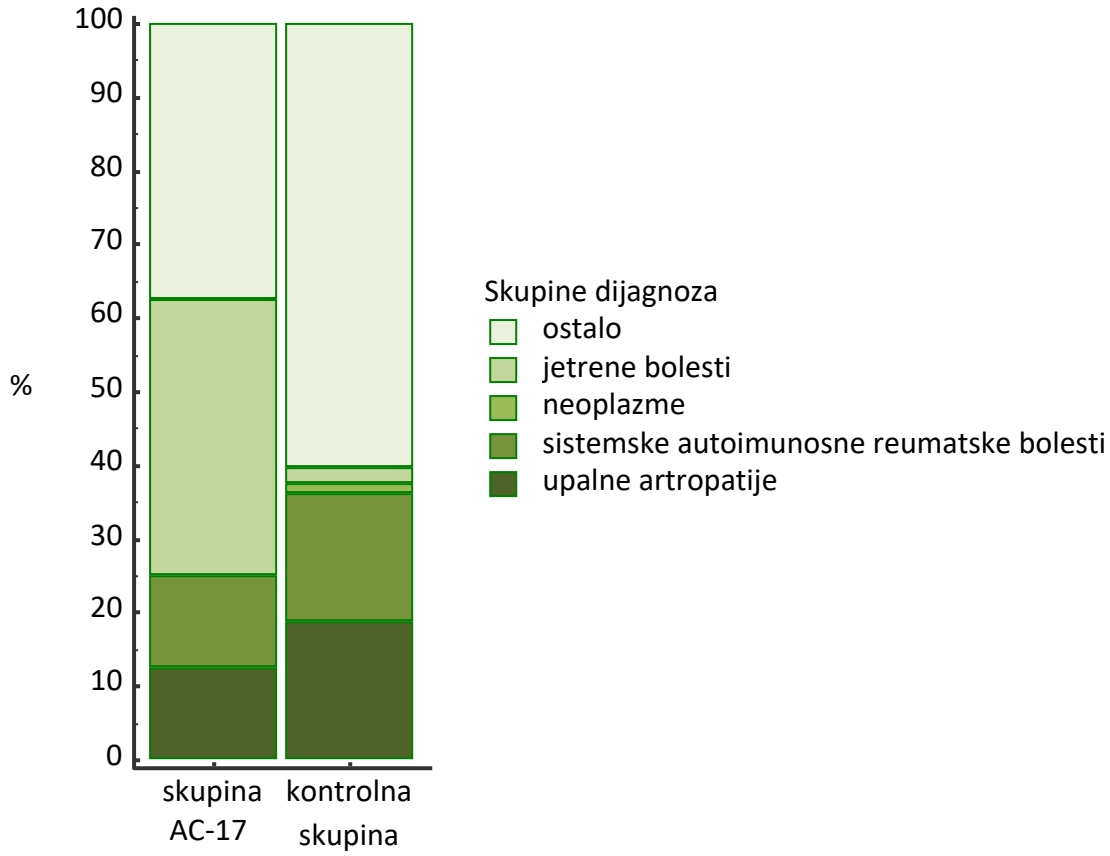
Ovaj se obrazac IF u ispitnoj skupini pojavljivao iznimno rijetko te je zabilježen u samo osam slučajeva (0,19 % svih ANA-pozitivnih slučajeva). S obzirom na tu činjenicu nije bilo moguće provesti analize u jednakom opsegu kao i za druge obrasce IF. Od tih osam ispitanika, u dva se slučaja radilo o muškarcima (25 %), a u šest slučajeva (75 %) o ženskima ispitanicima (p = 0,633 u odnosu na kontrolnu skupinu; Fisherov test). Medijan dobi tih ispitanika bio je 58 [IQR 51,5 – 64] godina, slično kao u kontrolnoj skupini (p = 0,507; Mann-Whitneyjev U-test). Specifična su protutijela bila prisutna u četvrtini slučajeva (p = 0,285 u odnosu na kontrolnu skupinu; Fisherov test; Slika 59).



Slika 59. Usporedba udjela ispitanika s prisutnim specifičnim protutijelima u ispitanika s prisutnim obrascem imunofluorescencije AC-17 i ispitanika u kontrolnoj skupini.

Jedan od tih pozitivnih ispitanika imao je pozitivna anti-U1-RNP protutijela, a drugi istodobno prisutna četiri protutijela: anti-dsDNA, anti-histoni, anti-PmScl i anti-PCNA.

Kod čak tri ispitanika (37,5 %) bila je prisutna dijagnoza jetrene bolesti, a kod po jednog ispitanika dijagnoze sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti i upalnih artropatija. Usprkos malim brojevima, dokazana je statistički znatno učestalija prisutnost jetrenih bolesti kod ovih ispitanika (p = 0,001; Fisherov test; Slika 60).

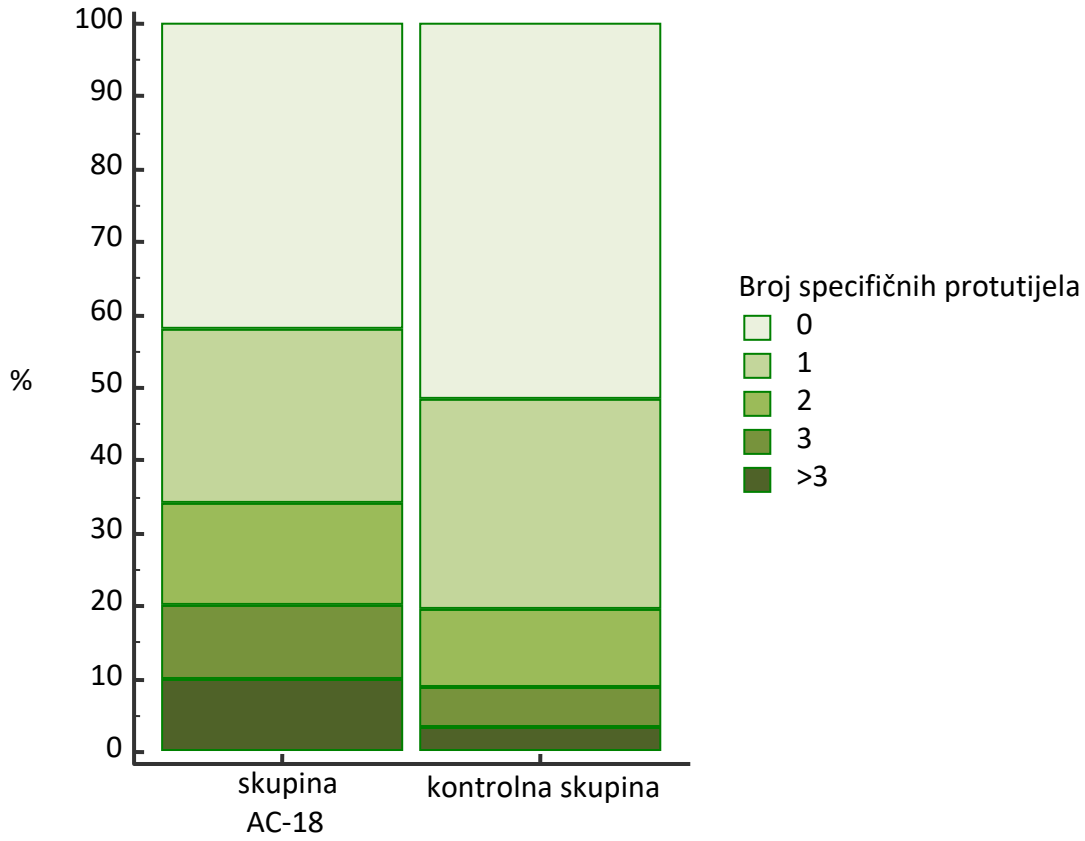


Slika 60. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-17 i u kontrolnoj skupini.

AC-18

Ovaj je obrazac IF bio prisutan u 50 ispitanika (1,22 % svih ANA pozitivnih ispitanika). Od tog broja, samo se u četiri slučaja radilo o muškarcima (8 %), ali nije dokazana znatna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,130; Fisherov test). Dob im je bila slična onoj ispitanika u kontrolnoj skupini, s medijanom od 58,5 [IQR 46 – 68] godina (p = 0,302; Mann-Whitneyjev U-test). Specifična su protutijela bila prisutna u više od polovice tih ispitanika, točnije u 29 ispitanika (58 %; p = 0,273 u odnosu na kontrolnu skupinu; Fisherov test).

U 12 ispitanika radilo se o jednom protutijelu, dok je više protutijela istodobno dokazano u 17 ispitanika, i to u sedam slučajeva po dva protutijela, a u po pet slučajeva tri ili više od tri istodobno prisutnih protutijela (p = 0,138; χ^2 test; Slika 61).



Slika 61. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-18 i kontrolne skupine ispitanika.

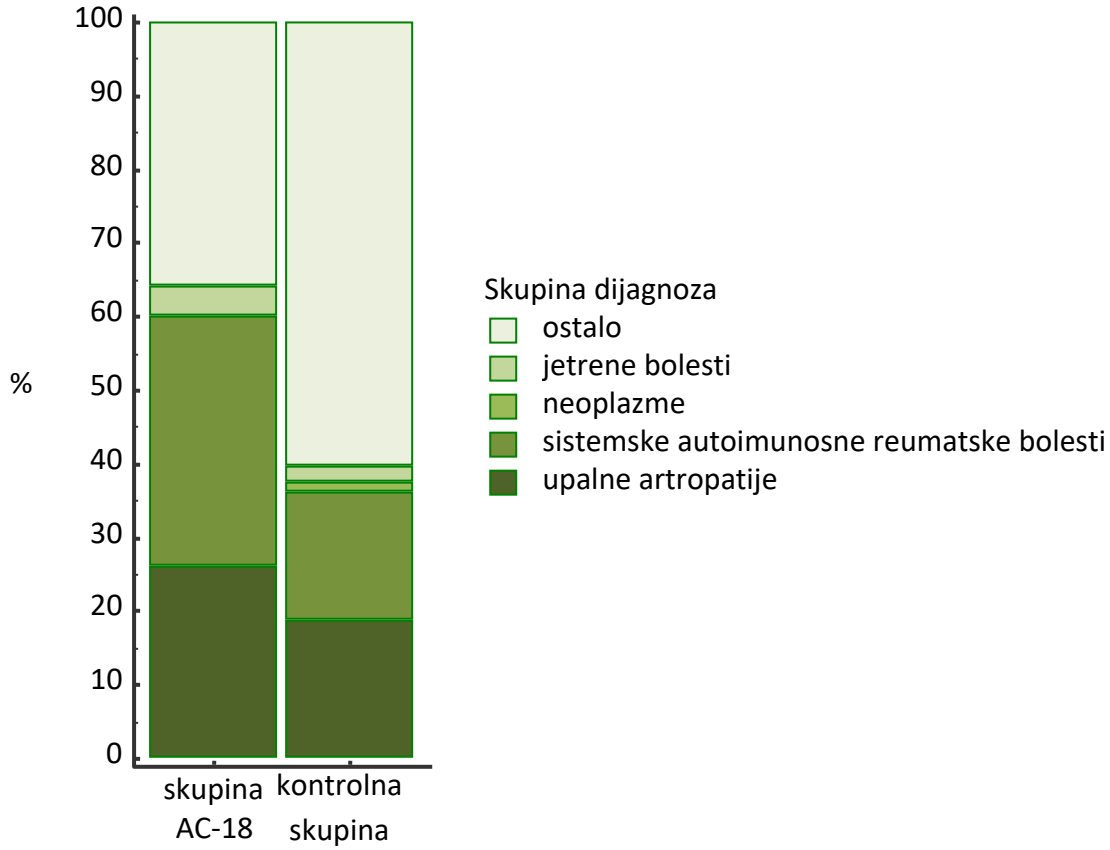
Učestalost prisutnosti pojedinih specifičnih protutijela između ispitanika s ovim obrascem IF i kontrolne skupine prikazana je u tablici 14.

Tablica 14. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-18 i ispitanika u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-18 (N=50)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	8	32	0,804
anti-SS-A (60kDa)	10	23	0,065
anti-TRIM21	12	31	0,087
anti-SS-B	9	16	**0,019**
anti-Sm	0	1	0,633
anti-U1-RNP	9	16	**0,019**
anti-Sm/RNP	3	6	0,248
anti-Scl-70	3	6	0,248
anti-Jo1	1	2	0,510
anti-CENP-B	1	12	0,302
anti-ribosomi	1	2	0,510
anti-histoni	2	11	0,761
anti-PmScl	3	13	0,986
anti-PCNA	3	17	0,349

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

Kod ovog je obrasca u velikom postotku slučajeva postojala neka od promatranih skupina dijagnoza, i to najčešće neka od bolesti iz spektra sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti, (n = 17; 34 %; p = 0,020 u odnosu na kontrolnu skupinu; Fisherov test). U 13 slučajeva bila je prisutna dijagnoza iz skupine upalnih artropatija (p = 0,335), a u dva slučaja dijagnoza jetrene bolesti (Slika 62).

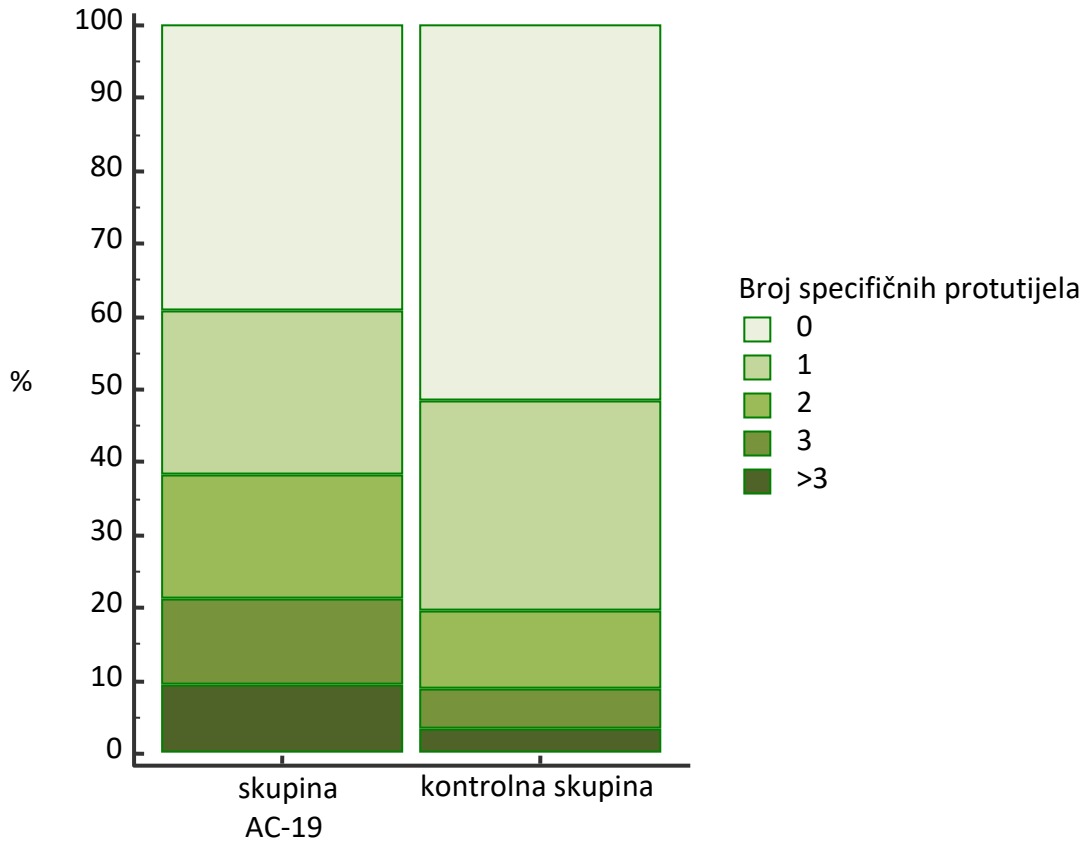


Slika 62. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-18 i u kontrolnoj skupini.

AC-19

Ispitanika s ovim obrascem IF bilo je više od svih drugih rijetkih obrazaca, s obzirom na to da je zabilježen u 314 slučajeva, odnosno 7,64 % ANA-pozitivnih ispitanika. Udio muških ispitanika bio je nešto veći nego u kontrolnoj skupini (n = 82, 26,11 %). S obzirom na veliki uzorak dokazana je razlika između ovih dviju skupina ispitanika (p = 0,020; Fisherov test). S druge strane, nije bilo razlike u dobi između ovih dviju skupina ispitanika, s medijanom dobi u AC-19 skupini od 54 [IQR 41 – 66] godine (p = 0,672; Mann-Whitneyjev U-test). Specifična protutijela bila su dokazana znatno učestalije u ovoj skupini ispitanika, (n = 197; 62,74 %; p = 0,001; Fisherov test).

Osobitost je ovog obrasca IF da su različita specifična protutijela često istodobno dokazana u uzorcima te je samo jedno specifično protutijelo bilo dokazano rjeđe nego u kontrolnoj skupini (n = 71; 36,04 % od 197 uzoraka s dokazanim specifičnim protutijelima; p = 0,0001; Fisherov test, Slika 63).



Slika 63. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-19 i kontrolne skupine ispitanika.

Dva su protutijela bila istodobno prisutna u 54 ispitanika, što je slično kontrolnoj skupini (27,41 %; p = 0,409; Fisherov test), kao i tri protutijela koja su bila prisutna u 37 ispitanika (18,78 %; p = 0,104; Fisherov test). Više od tri protutijela dokazano je u 29 ispitanika (14,72 %; p = 0,041; Fisherov test).

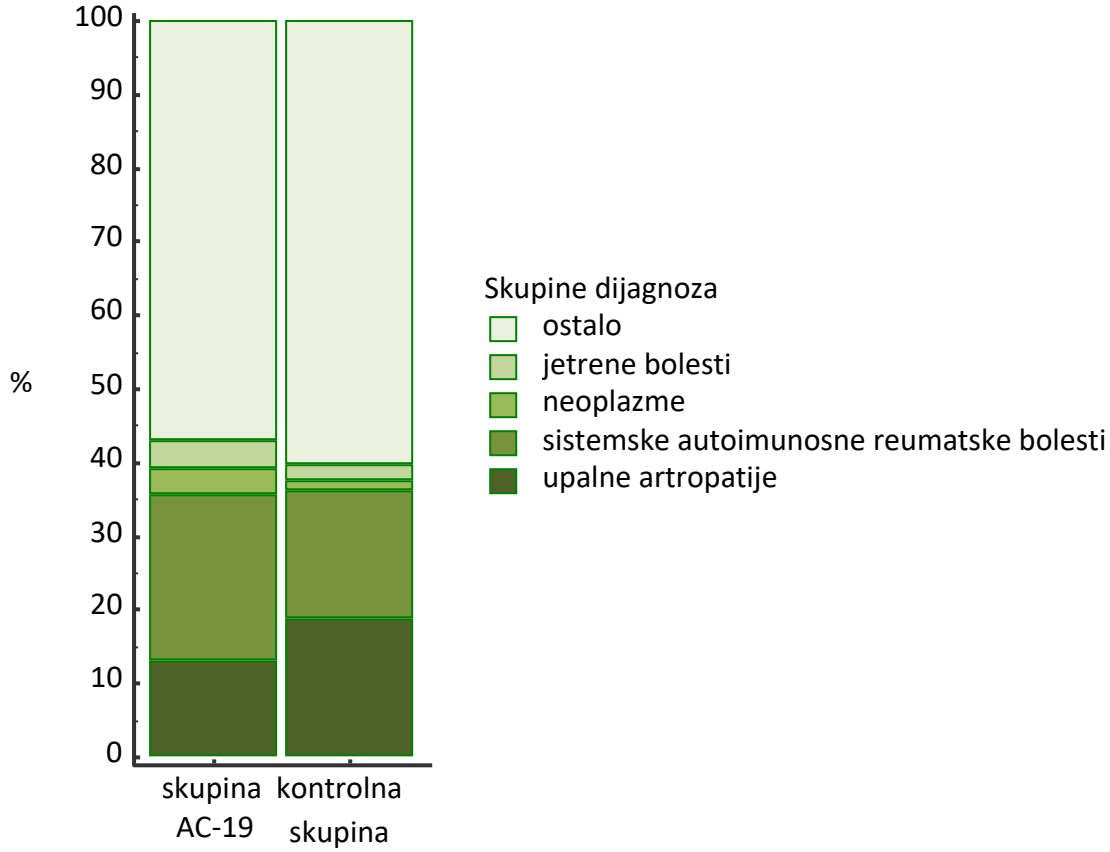
Učestalost nalaza pojedinih specifičnih protutijela u skupini ispitanika s ovim obrascem IF i ispitanika u kontrolnoj skupini prikazana je u tablici 15.

Tablica 15. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-19 i ispitanika u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-19 (N=314)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	88	32	**0,0003**
anti-SS-A (60kDa)	63	23	**0,003**
anti-TRIM21	101	31	**<0,0001**
anti-SS-B	29	16	0,431
anti-Sm	3	1	0,512
anti-U1-RNP	34	16	0,170
anti-Sm/RNP	9	6	0,931
anti-Scl-70	8	6	0,892
anti-Jo1	10	2	0,082
anti-CENP-B	7	12	**0,047**
anti-ribosomi	21	2	**0,001**
anti-histoni	37	11	**0,007**
anti-PmScl	25	13	0,371
anti-PCNA	31	17	0,492

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

U ovoj je skupini ispitanika dijagnoza neke od sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti zabilježena u 71 bolesnika (22,61 %; p = 0,156; Fisherov test). Upalne artropatije zabilježene su u 41 bolesnika, jednako kao i u kontrolnoj skupini, a slični udjeli bili su i ispitanika s dijagnozama jetrenih ili tumorskih bolesti (Slika 64).

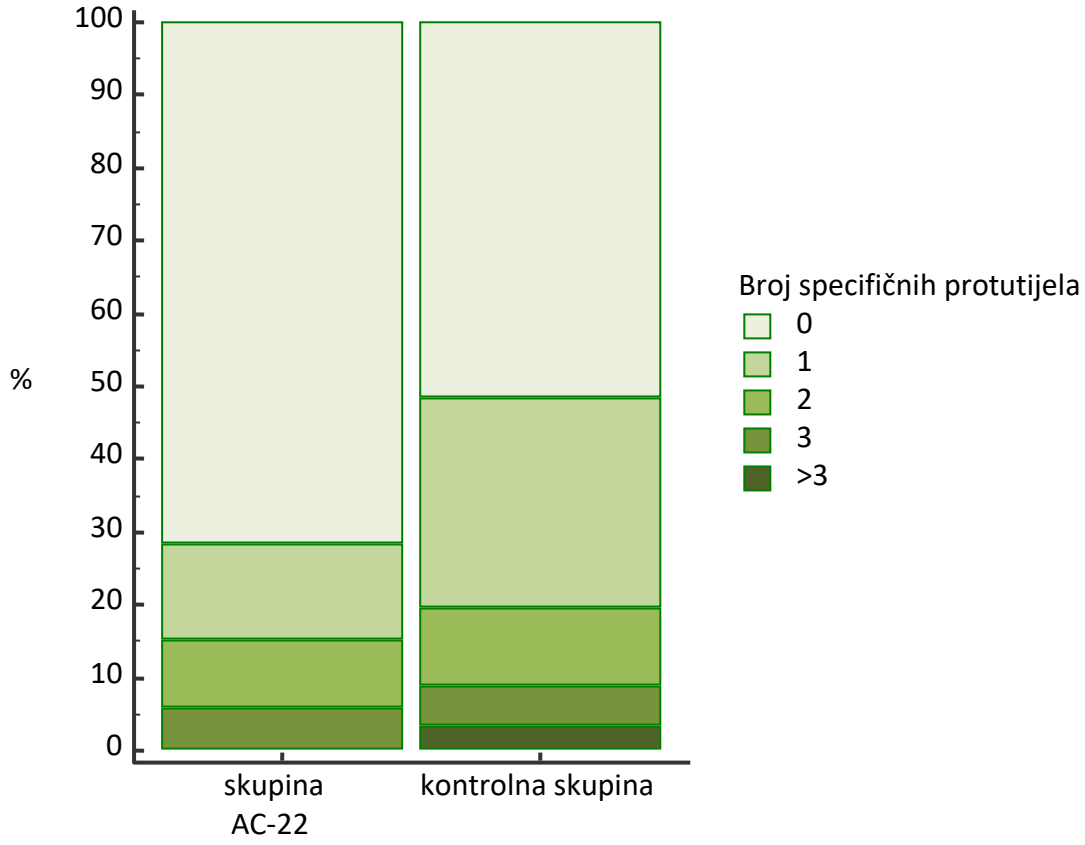


Slika 64. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-19 i u kontrolnoj skupini.

AC-22

Ovaj je obrazac uočen u 53 ispitanika, tj. u 1,29 % ANA-pozitivnih uzoraka. Znatno je češće uočen u muških ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu (n = 19; p = 0,005; Fisherov test). Medijan dobi ovih ispitanika bio je sličan onom u kontrolnoj skupini (54 [IQR 37,75 – 64,25] godine; p = 0,420; Mann-Whitneyjev U-test). U ovih je ispitanika zabilježena manja učestalost specifičnih protutijela (n = 15; 28,30 %; p = 0,009; Fisherov test).

U ispitanika s dokazanim specifičnim protutijelima najčešće se radilo o jednom protutijelu (n = 7), ali ispitanici s po dva ili tri protutijela nisu bili mnogo rjeđi, bez statističke važnosti, moguće zbog malog broja ispitanika kod kojih je uočen ovaj obrazac (Slika 65).



Slika 65. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-22 i kontrolne skupine ispitanika.

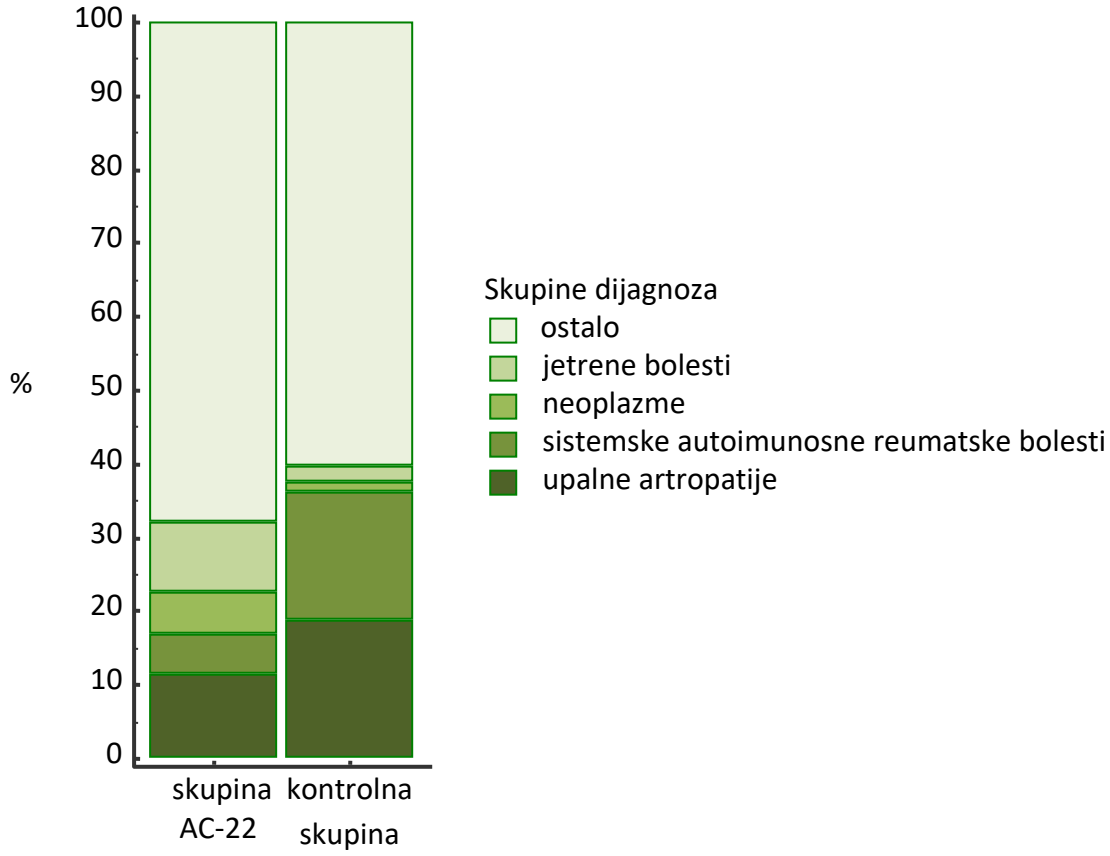
Učestalost prisutnosti pojedinih specifičnih protutijela u skupini ispitanika s ovim obrascem IF i ispitanika kontrolnoj skupini prikazana je u tablici 16.

Tablica 16. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-22 i ispitanika u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-22 (N=53)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	5	32	0,325
anti-SS-A (60kDa)	3	23	0,282
anti-TRIM21	4	31	0,198
anti-SS-B	2	16	0,354
anti-Sm	0	1	0,623
anti-U1-RNP	3	16	0,674
anti-Sm/RNP	0	6	0,224
anti-Scl-70	1	6	0,725
anti-Jo1	0	2	0,486
anti-CENP-B	1	12	0,272
anti-ribosomi	1	2	0,543
anti-histoni	1	11	0,319
anti-PmScl	3	13	0,939
anti-PCNA	2	17	0,307

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

U ispitanika s ovim obrascem IF dijagnoze tumorskih (3/53) i sistemskih autoimunosnih reumatskih (3/53) bolesti pojavljivale su se s jednakom učestalošću. U odnosu na kontrolnu skupinu, nema statistički bitne razlike u pojavljivanju za tumorske (p = 0,090; Fisherov test), a sistemske autoimunosne reumatske bolesti pojavljivale su se znatno rjeđe (p = 0,033; Fisherov test). Jetrene bolesti (5/53) pojavljivale su se znatno češće (p = 0,027; Fisherov test) nego u kontrolnoj skupini. U pojavnosti upalnih artropatija (6/53) nije bilo statistički bitne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,230; Fisherov test; Slika 66).

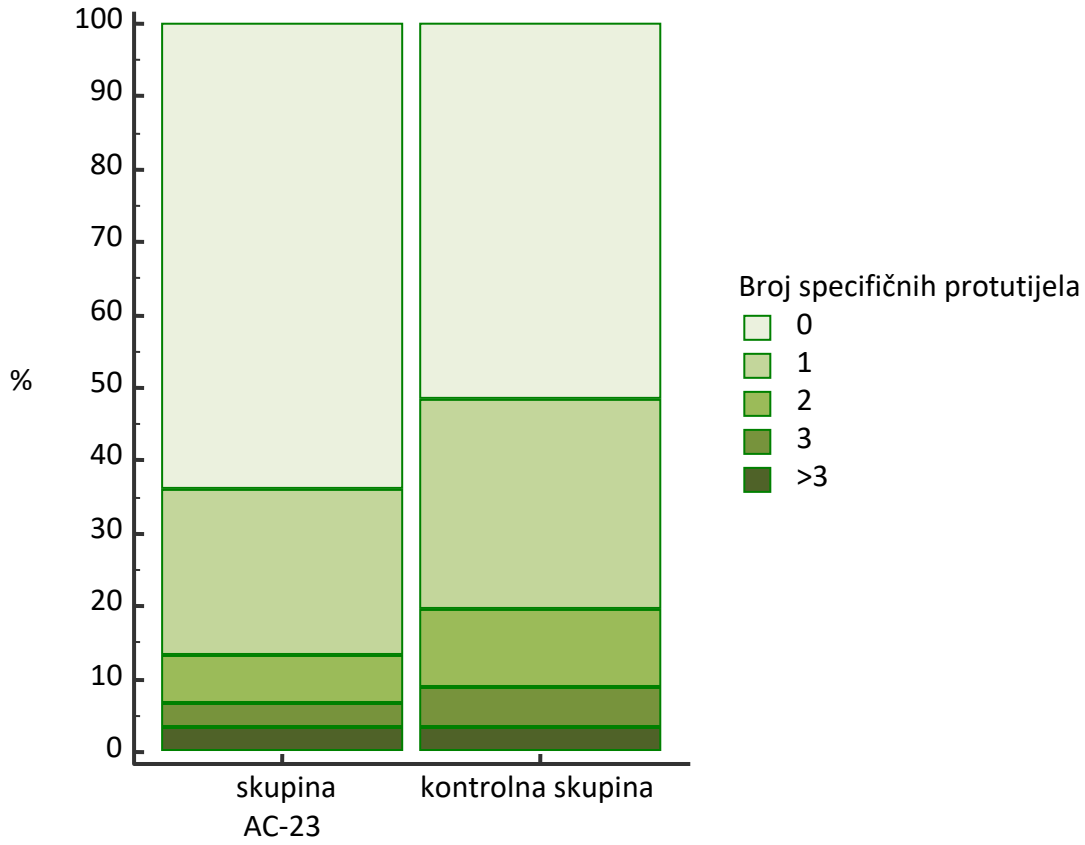


Slika 66. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-22 i u kontrolnoj skupini

AC-23

Ovaj obrazac IF uočen je u 61 ispitanika (1,48 % svih ANA-pozitivnih ispitanika), a raspodjela ispitanika po spolu ne razlikuje se u odnosu na kontrolnu skupinu: 13 muških (21,31 %) prema 48 ženskih ispitanika (78,69 %) (p = 0,456; Fisherov test). Dob ispitanika također je slična onoj u kontrolnoj skupini, s medijanom od 58 [IQR 42,5 – 67] godina (p = 0,479; Mann Whitneyjev U-test). Sličan je bio i udio ispitanika s pozitivnim specifičnim protutijelima (22 ispitanika; 36,06 %; p = 0,109; Fisherov test).

Najčešće se u ovih ispitanika radilo o jednom protutijelu (n = 14), dva su protutijela bila istodobno prisutna u četiri ispitanika, a u po dva ispitanika radilo se o tri ili više od tri istodobno prisutna protutijela (p = 0,507; χ^2 test; Slika 67).



Slika 67: Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-23 i kontrolne skupine ispitanika.

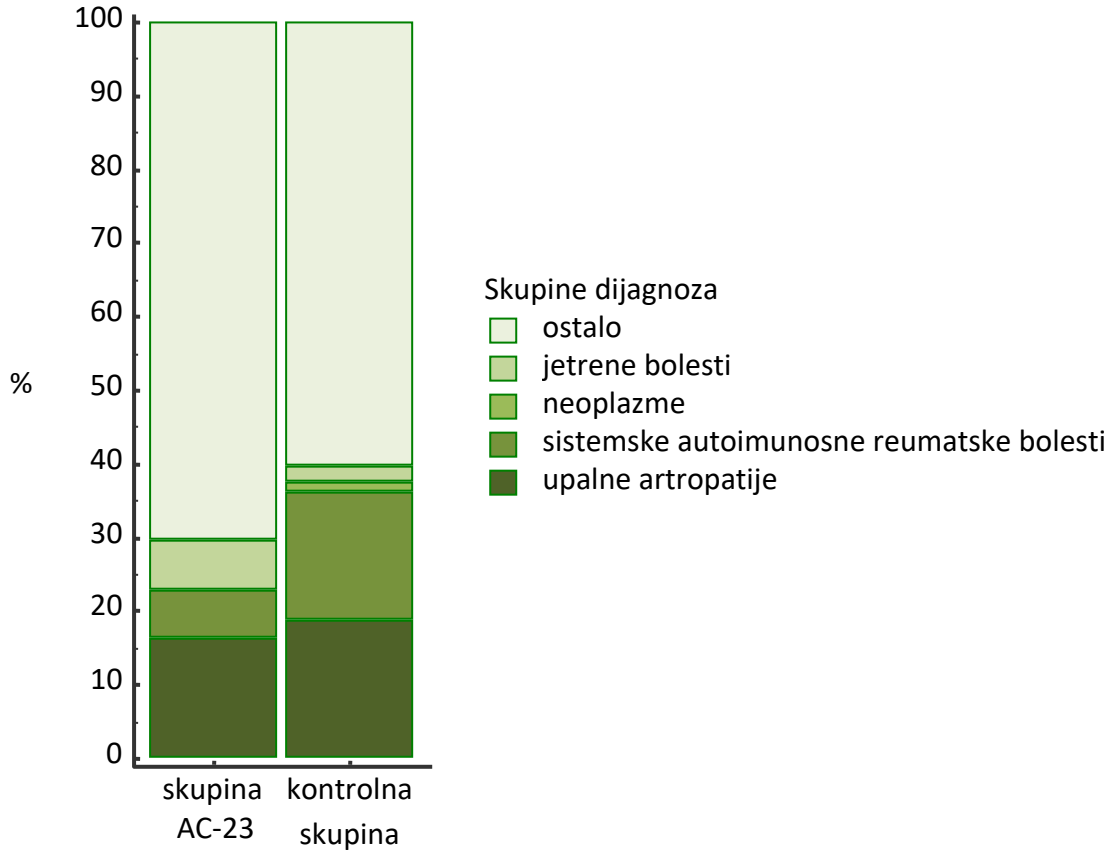
Učestalost prisutnosti pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s ovim obrascem IF i u ispitanika kontrolne skupine prikazana je u tablici 17.

Tablica 17. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-23 i ispitanika u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-23 (N=61)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	7	32	0,532
anti-SS-A (60kDa)	4	23	0,357
anti-TRIM21	2	31	**0,020**
anti-SS-B	3	16	0,512
anti-Sm	1	1	0,333
anti-U1-RNP	8	16	0,153
anti-Sm/RNP	2	6	0,824
anti-Scl-70	0	6	0,192
anti-Jo1	0	2	0,455
anti-CENP-B	0	12	0,062
anti-ribosomi	0	2	0,455
anti-histoni	4	11	0,638
anti-PmScl	3	13	0,858
anti-PCNA	5	17	0,911

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

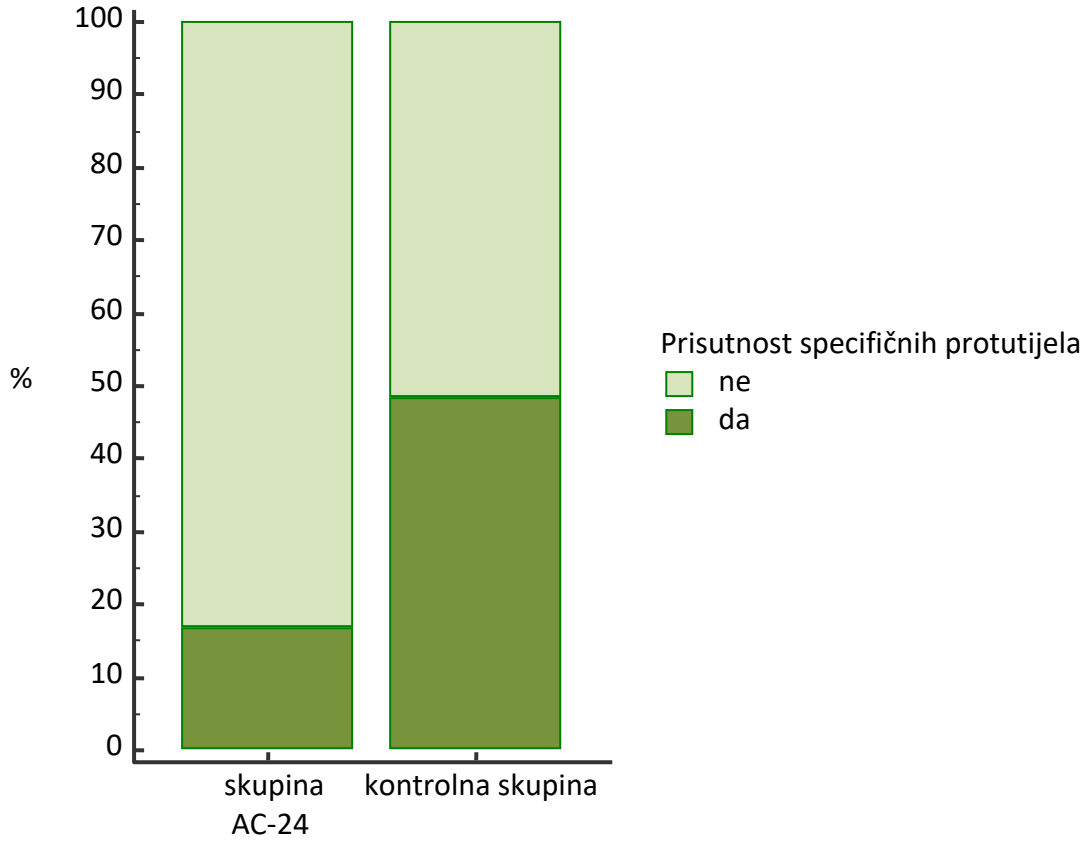
U ovih su se ispitanika dijagnoze iz skupine sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti pojavljivale rjeđe nego u kontrolnoj skupini (n = 4; 6,56 %; p = 0,042; Fisherov test), dok u drugih skupina dijagnoza nisu uočene takve razlike, uključujući i jetrene bolesti (četiri slučaja; 6,56 %; p = 0,108; Fisherov test; Slika 68).



Slika 68. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-23 i u kontrolnoj skupini

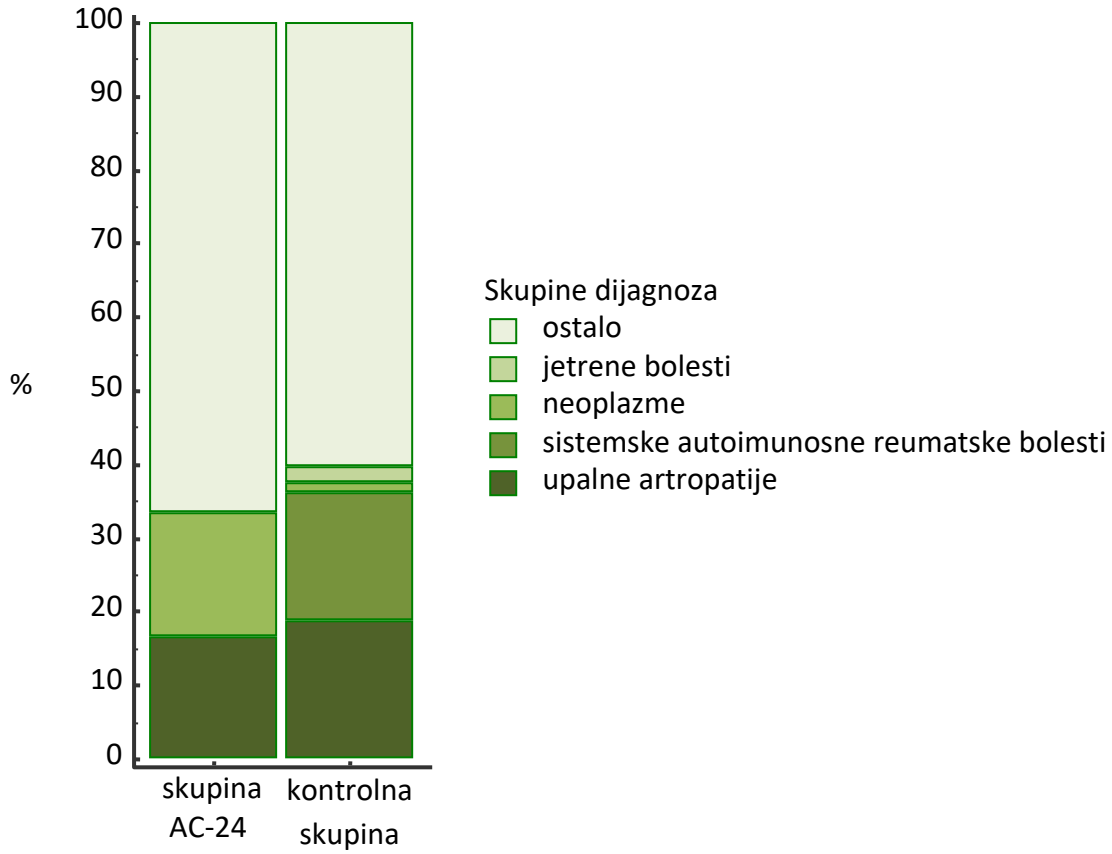
AC-24

Ispitanika s ovim obrascem IF bilo je iznimno malo, svega šestero ispitanika (0,15 % svih ANA-pozitivnih uzoraka), što čini nemogućim provođenje svih planiranih analiza. Ipak, već se pri ovom broju ispitanika uočava muška predominacija (četiri ispitanika; 66,66 %; p = 0,012; Fisherov test). Ovi ispitanici doimaju se i znatno mlađima od ispitanika u kontrolnoj skupini, s medijanom od 33 [IQR 23 – 64] godine, što je i s ovim brojem ispitanika na granici statističke važnosti (p = 0,077; Mann-Whitneyjev U-test). Specifična protutijela pronađena su u samo jednog od tih ispitanika (16,66 %; p = 0,216; Slika 69), a radilo se o anti-TRIM21 protutijelu.



Slika 69: Usporedba udjela ispitanika s prisutnim specifičnim protutijelima u ispitanika s prisutnim obrascem imunofluorescencije AC-24 i ispitanika u kontrolnoj skupini.

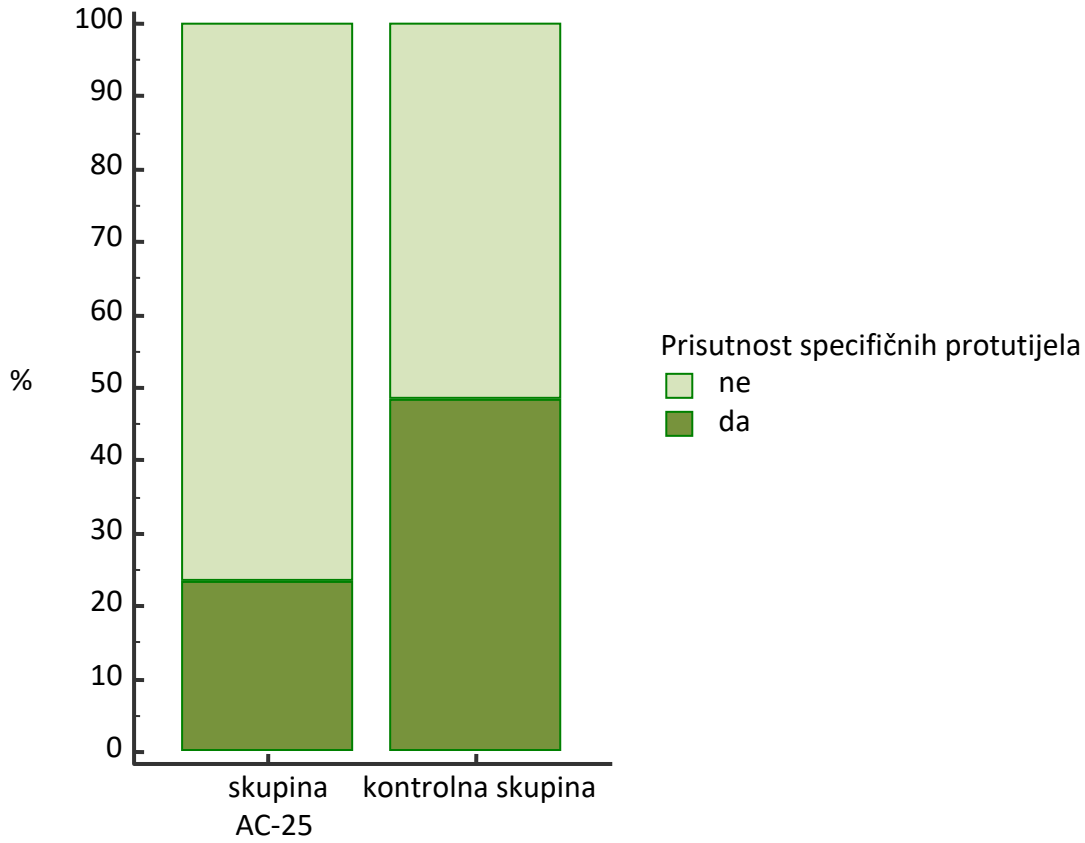
Jedan od ovih ispitanika imao je dijagnozu upalne artropatije, jedan ekspanzivni proces, a u ostalih ispitanika dijagnoze nisu pripadale niti jednoj od analiziranih skupina dijagnoza, što s obzirom na mali ukupni broj ispitanika nije statistički različito od kontrolne skupine (Slika 70).



Slika 70. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-24 i u kontrolnoj skupini.

AC-25

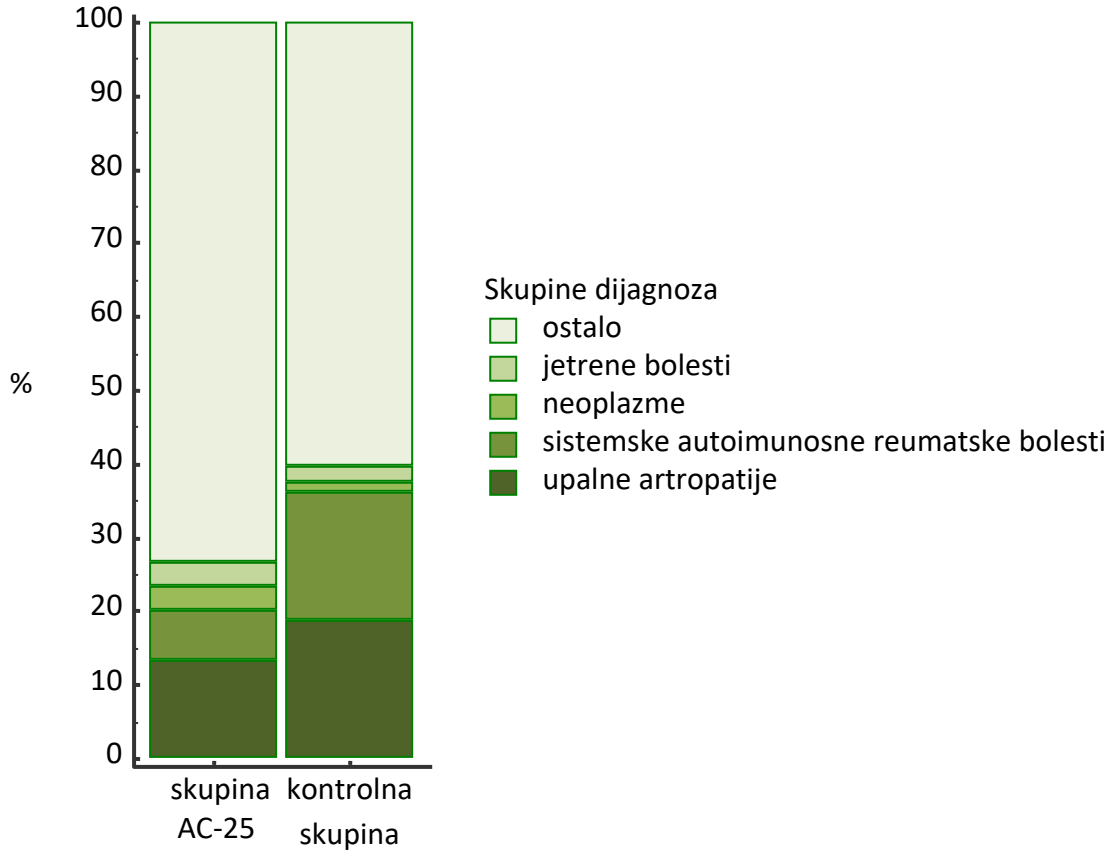
Ispitanika s ovim obrascem IF bilo je 30 (0,73 % svih ANA-pozitivnih ispitanika), s većim udjelom muških ispitanika nego u kontrolnoj skupini (n = 11; 36,67 %; p = 0,024; Fisherov test). Dob ovih ispitanika bila je slična kao u kontrolnoj skupini, s medijanom od 54 [IQR 39 – 62] godine (p = 0,319; Mann-Whitneyjev U-test). Ispitanici su znatno rjeđe imali prisutna specifična protutijela (n = 7; 23,33 %; p = 0,010; Fisherov test; Slika 71).



Slika 71. Usporedba udjela ispitanika s prisutnim specifičnim protutijelima u ispitanika s prisutnim obrascem imunofluorescencije AC-25 i ispitanika u kontrolnoj skupini.

U svim osim u jednom slučaju radilo se o nalazu samo jednog protutijela, bez naznaka veće učestalosti nekog od tih protutijela.

Udjeli pojedinih skupina dijagnoza nisu se razlikovali u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0{,}436$; χ^2 test; Slika 72).

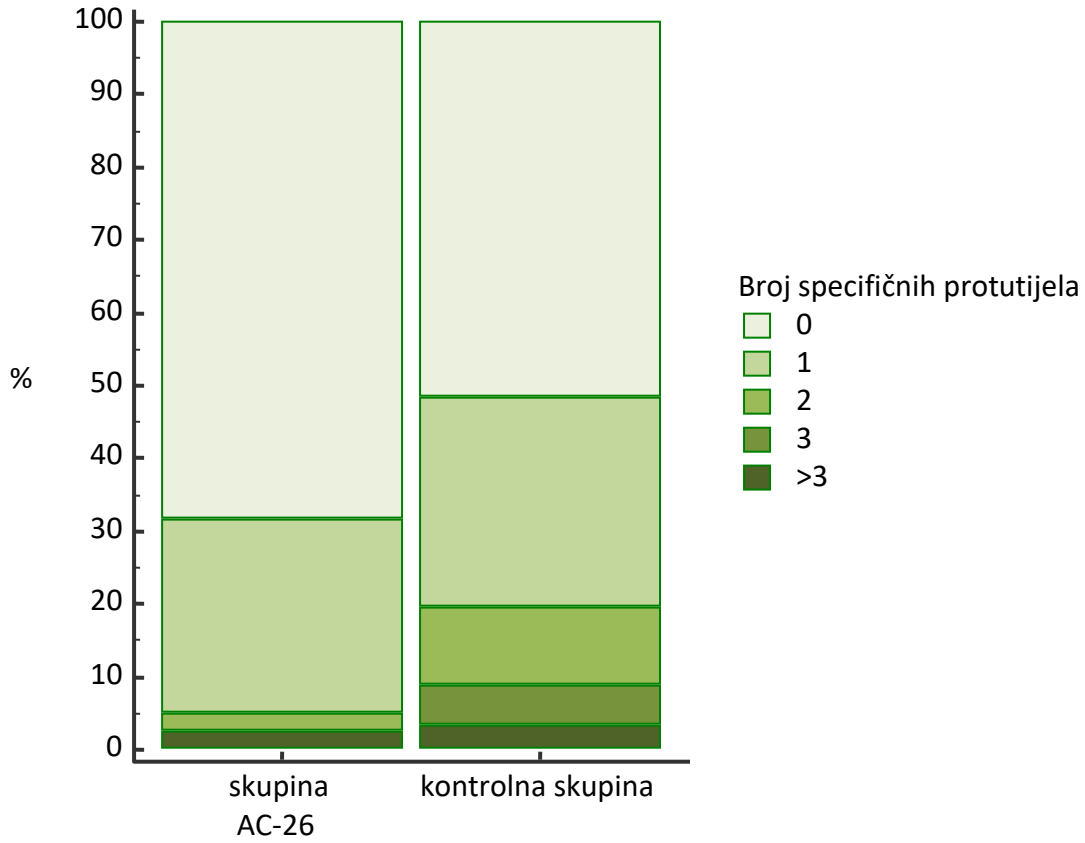


Slika 72. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-25 i u kontrolnoj skupini.

AC-26

Ispitanika s ovim obrascem IF bilo je 41, što čini 0,99 % ANA-pozitivnih ispitanika. Od tih ispitanika 12 je bilo muškog spola (29,27 %), a 29 ženskog spola (70,73 %). U ovom obrascu nazire se nešto manja predominacija ženskih ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez statističke važnosti (p = 0,086; Fisherov test). Medijan dobi ovih ispitanika sličan je onome u kontrolnoj skupini i iznosi 53 [IQR 43 – 65,25] godine; p = 0,807; Mann Whitneyjev U-test.

Specifična protutijela bila su prisutna u 13 ispitanika (31,70 %), iz čega se može naslutiti njihova nešto manja učestalost u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,060; Fisherov test). U svim osim u dvama slučajevima radilo se o jednom specifičnom protutijelu, a od ta dva slučaja u jednom se radilo o dvama protutijelima, a u drugom o više od tri istodobno prisutna protutijela (p = 0,150; χ^2 test; Slika 73).



Slika 73. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-26 i kontrolne skupine.

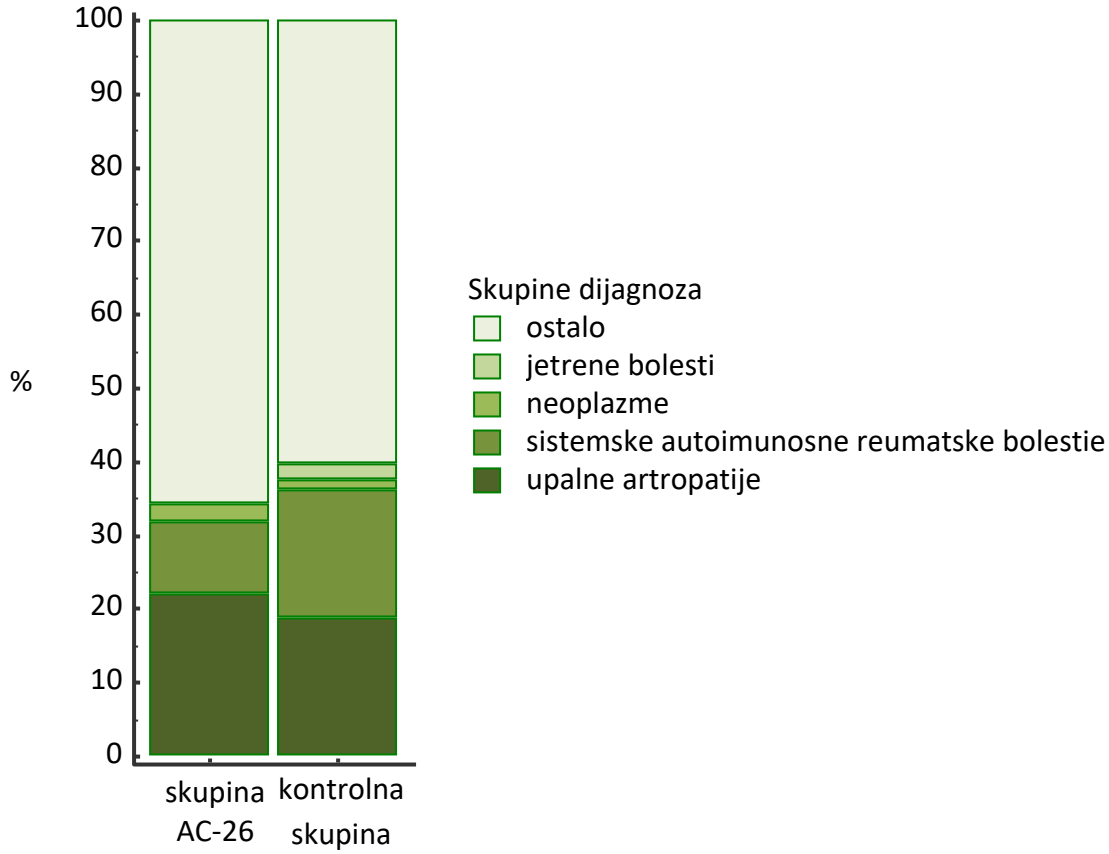
Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u skupini ispitanika s ovim obrascem IF i ispitanika kontrolne skupine prikazana je u tablici 18.

Tablica 18. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-26 i u ispitanika u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-26 (N=41)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	3	32	0,210
anti-SS-A (60kDa)	2	23	0,263
anti-TRIM21	1	31	**0,037**
anti-SS-B	0	16	0,075
anti-Sm	0	1	0,665
anti-U1-RNP	4	16	0,588
anti-Sm/RNP	1	6	0,913
anti-Scl-70	1	6	0,913
anti-Jo1	1	2	0,402
anti-CENP-B	2	12	0,876
anti-ribosomi	1	2	0,402
anti-histoni	0	11	0,143
anti-PmScl	2	13	0,790
anti-PCNA	0	17	0,066

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

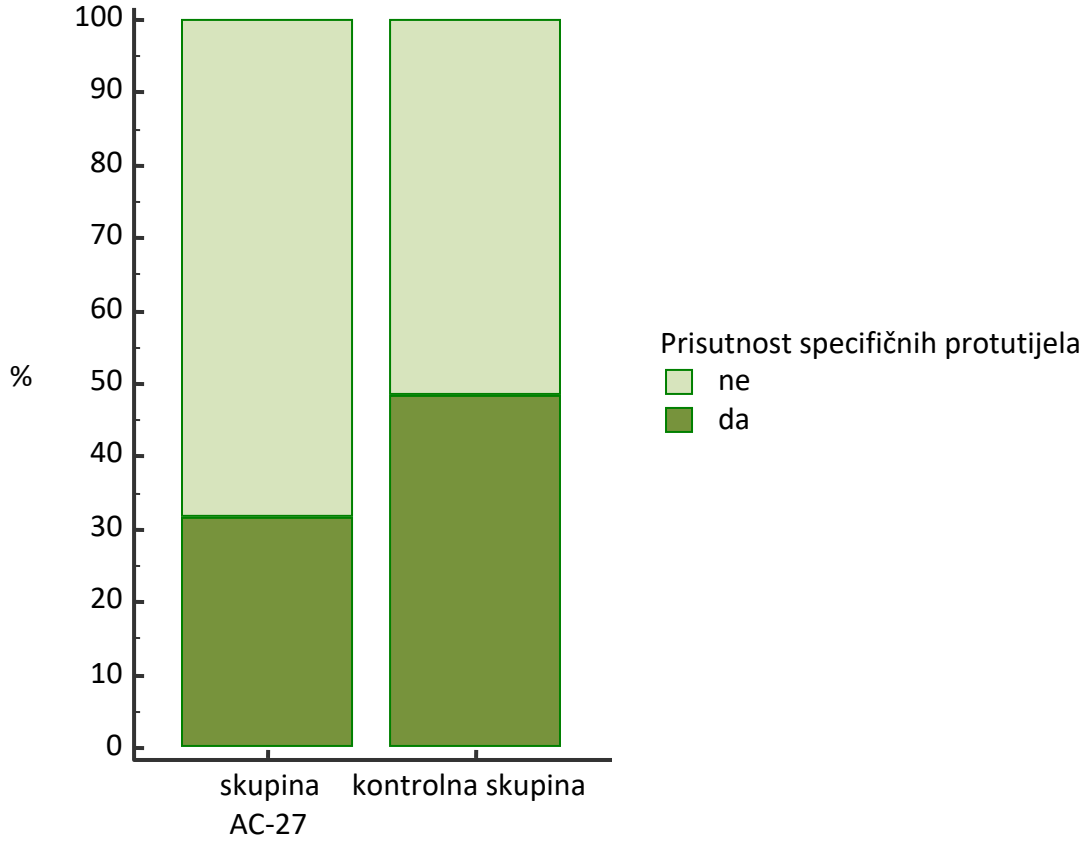
Raspodjela kliničkih dijagnoza koje su se pojavljivale u ispitanika s ovim obrascem IF ne razlikuje se od raspodjele u kontrolnoj skupini (p = 0,594; χ^2 test), a najčešće su bile one iz skupine upalnih artropatija (n = 9; 21,95 %), dok je dijagnoza iz skupine sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti bilo više nego dvostruko manje (n = 4; 9,76 %; Slika 74).



Slika 74. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-26 i u kontrolnoj skupini.

AC-27

Ovaj obrazac IF detektiran je u 19 ispitanika, tj. u 0,46 % svih ANA-pozitivnih ispitanika. Zabilježen je u četiri muška (21,05 %) i 15 ženskih ispitanika (78,95 %), bez dokazane razlike u odnosnu na kontrolnu skupinu (p = 0,753; Fisherov test). Medijan dobi ovih ispitanika doima se nižim (48 [IQR 38,5 – 66] godina), ali važnost razlike u odnosu na kontrolnu skupinu nije moguće dokazati uz ovaj broj ispitanika s tim obrascem (p = 0,719; Mann-Whitneyjev U-test). Prisutnost specifičnih protutijela dokazana je u šest ispitanika (31,58 %), bez dokazane razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,231; Fisherov test; Slika 75).

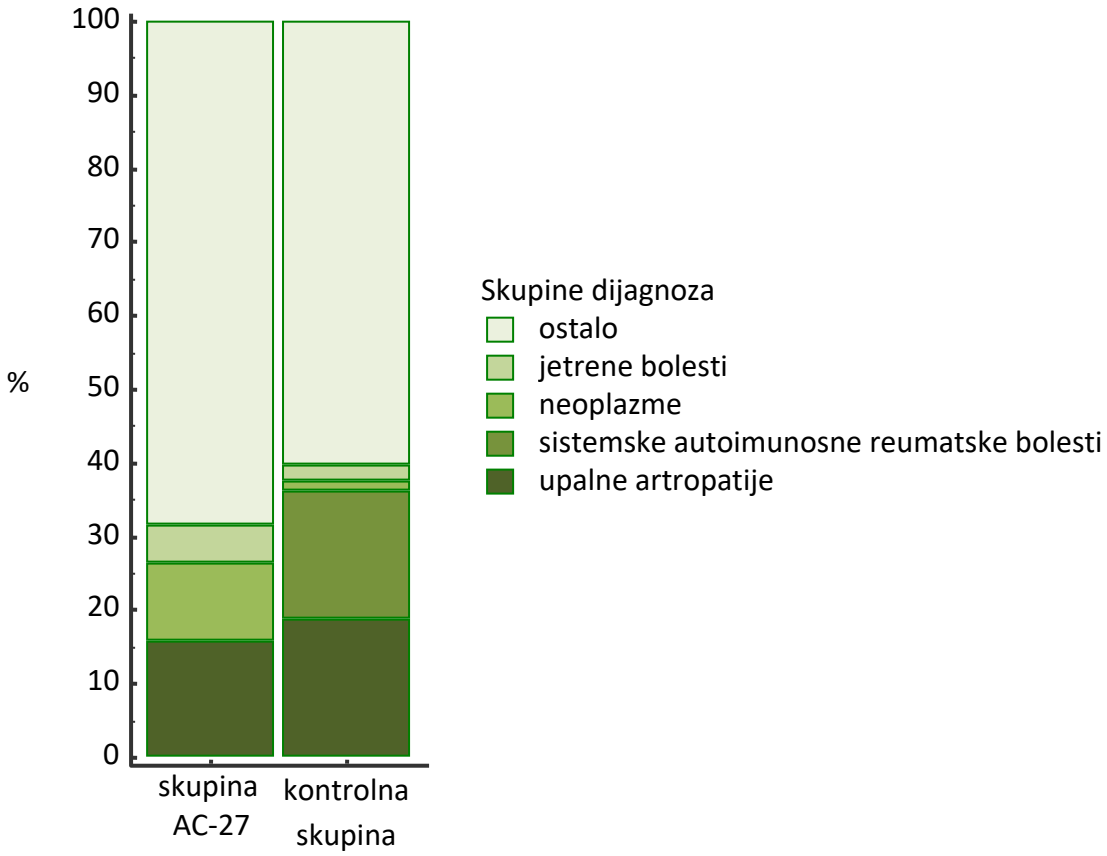


Slika 75. Usporedba udjela ispitanika s prisutnim specifičnim protutijelima u ispitanika s prisutnim obrascem imunofluorescencije AC-27 i ispitanika u kontrolnoj skupini.

U četiri ispitanika bilo je dokazano po jedno specifično protutijelo, a u dva ispitanika istodobno je bilo prisutno više od tri protutijela. Uzorak nije prikladan za analizu frekvencije

prisutnosti pojedinih protutijela, ali se napominje prisutnost anti-PCNA protutijela u čak polovine ovih ispitanika u kojih je dokazano specifično protutijelo (n = 3).

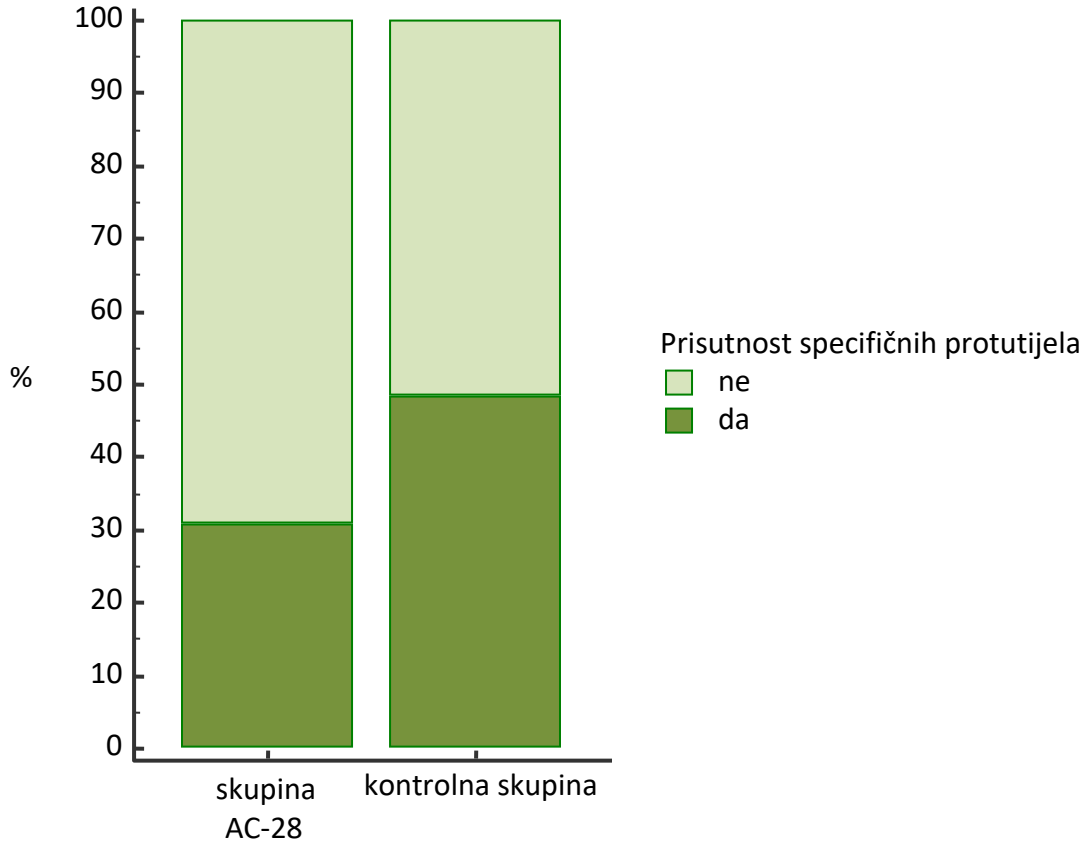
Od ovih 19 ispitanika, u tri je vodeća dijagnoza bila neka od upalnih artropatija, u dva ispitanika bila je prisutna tumorska bolest (p = 0,052; Fisherov test), a u jednog jetrena bolest. Niti jedan od ovih ispitanika nije imao dijagnozu sistemske autoimunosne reumatske bolesti (p = 0,049; Fisherov test; Slika 76).



Slika 76. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-27 i u kontrolnoj skupini.

AC-28

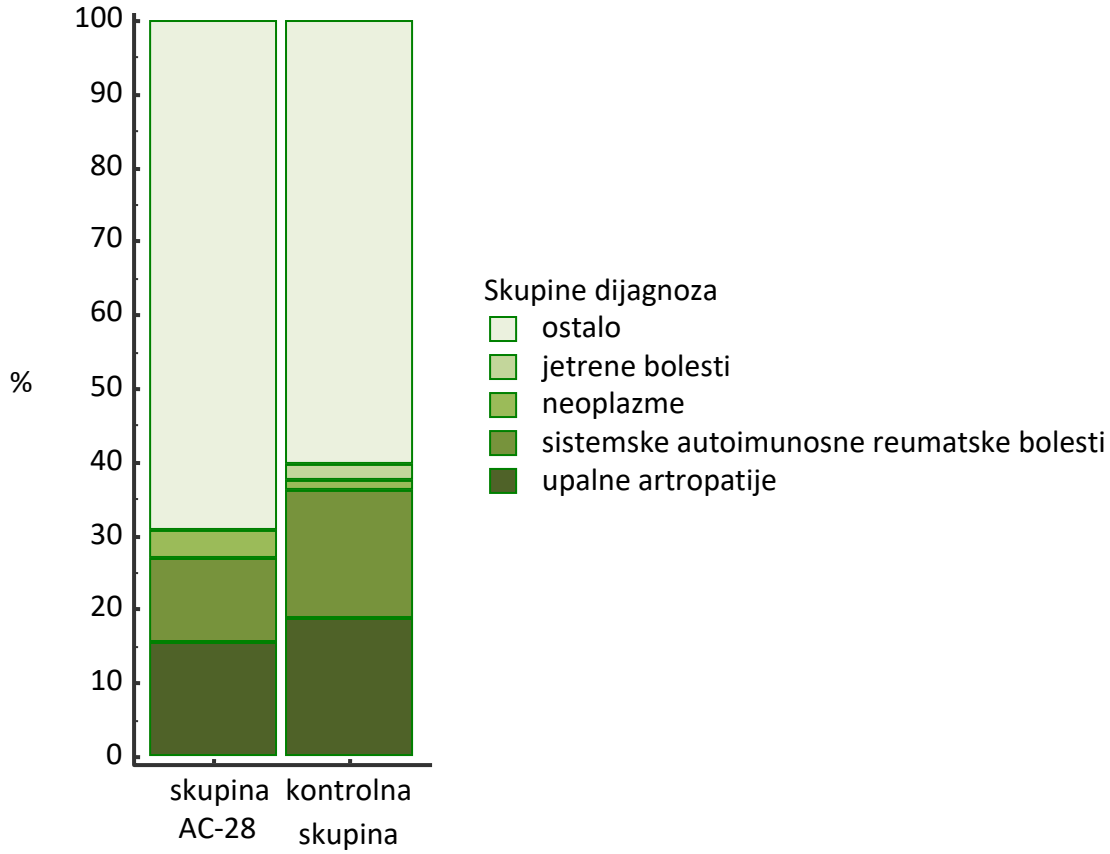
Ispitanika s ovim obrascem IF bilo je tek nešto više nego u prethodnom obrascu, tj. 26 ili 0,63 % ANA-pozitivnih ispitanika. Radilo se o trima muškima (11,54 %) i 23 ženska ispitanika (88,46 %), bez razlike u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,585; Fisherov test). Po dobi se ovi ispitanici također ne razlikuju u odnosu na kontrolnu skupinu, a imaju medijan dobi od 59 [IQR 50 – 66] godina (p = 0,736; Mann-Whitneyjev U-test). Specifična su protutijela detektirana u osam ispitanika iz ove skupine (30,77 %; p = 0,099; Fisherov test; Slika 77).



Slika 77. Usporedba udjela ispitanika s prisutnim specifičnim protutijelima u ispitanika s prisutnim obrascem imunofluorescencije AC-28 i ispitanika u kontrolnoj skupini.

U pet ispitanika detektirano je jedno protutijelo, po dva protutijela pronađena su u dva ispitanika, a u jednom slučaju radilo se o više od tri istodobno prisutna protutijela. Nema naznaka o eventualnim razlikovnim karakteristikama ovog obrasca što se tiče vrste specifičnih protutijela.

Raspodjela dijagnoza u ovih ispitanika ne razlikuje se u odnosu na kontrolnu skupinu te se u četiri slučaja (15,38 %) radilo o dijagnozi iz skupine upalnih artropatija, kod tro ispitanika dijagnoza je bila iz skupine sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti, a u jednog ispitanika postojao je neoplastički proces ($p = 0,666$; χ^2 test; Slika 78).

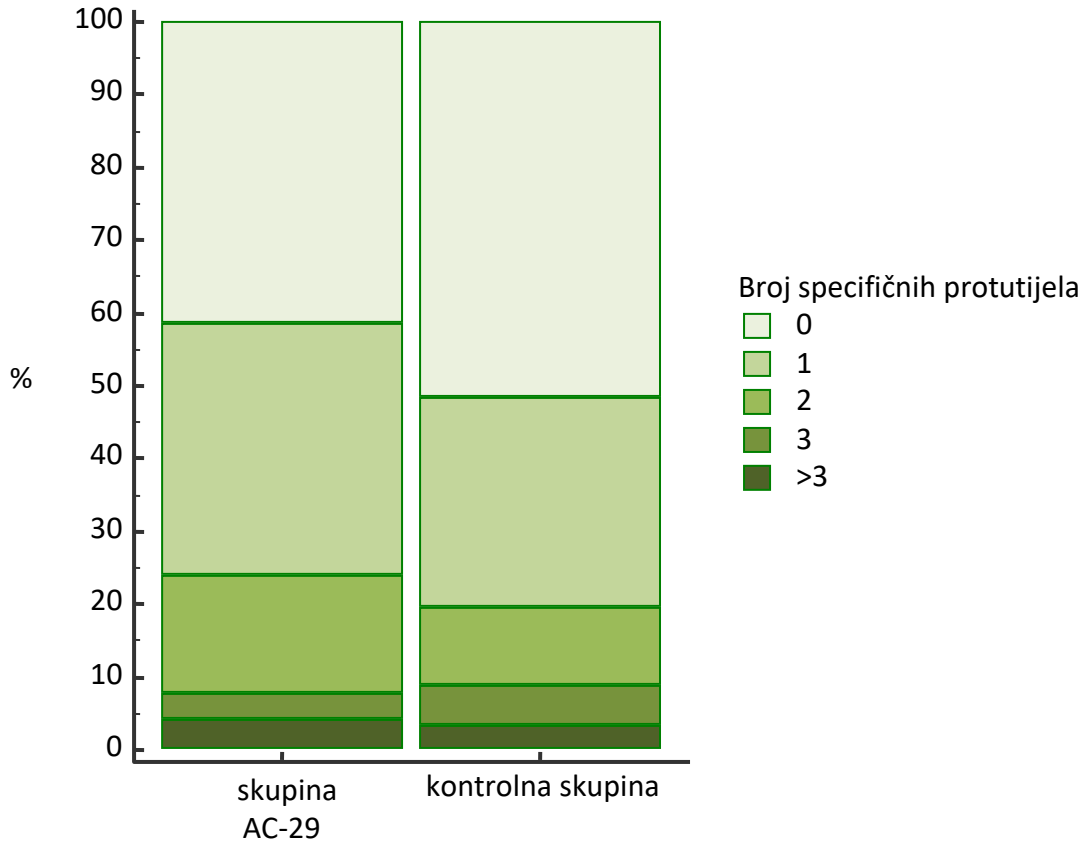


Slika 78. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-28 i u kontrolnoj skupini.

AC-29

Ovaj je obrazac IF evidentiran znatno češće od nekih ranije opisanih te je uočen u 142 ispitanika (3,46 % ANA pozitivnih ispitanika). Radilo se o 16 muških (11,27 %) i 126 ženskih ispitanika (88,73 %; p = 0,132; Fisherov test). Ti su ispitanici imali medijan dobi od 55,5 [IQR 43 – 67] godina, čime se nisu razlikovali u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,620; Mann-Whitneyjev U-test). Specifična su protutijela u ovih ispitanika bila prisutna učestalije nego u kontrolnoj skupini, a dokazana su u 86 ispitanika (60,56 %; p = 0,030; Fisherov test).

U 49 slučajeva radilo se o jednom protutijelu, dva su protutijela istodobno dokazana u 23 slučaja, tri protutijela u pet slučajeva, a više od tri specifična protutijela bila su prisutna kod šestero ispitanika (p = 0,239; χ^2 test; Slika 79).



Slika 79. Usporedba udjela ispitanika prema broju istodobno prisutnih specifičnih protutijela između grupe s obrascem imunofluorescencije AC-29 i kontrolne skupine ispitanika.

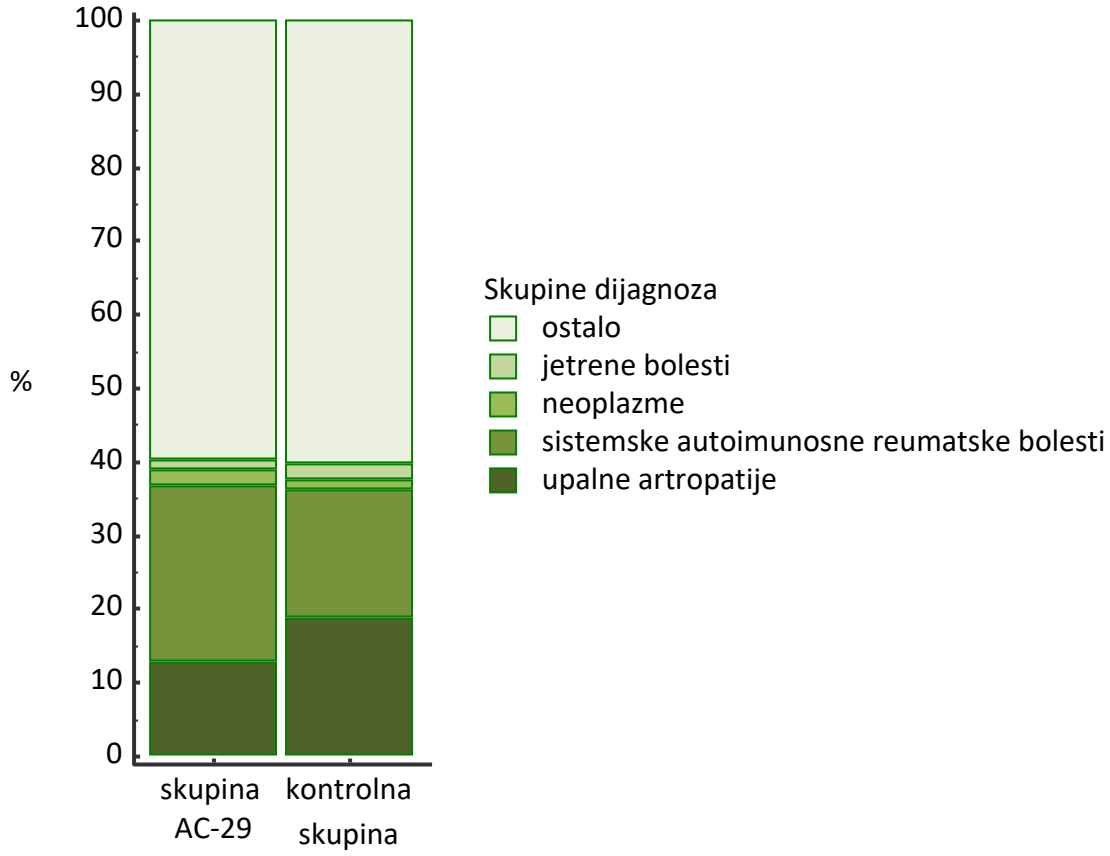
Učestalost prisutnosti pojedinih specifičnih protutijela u skupini ispitanika s ovim obrascem IF i ispitanika kontrolne skupine prikazana je u tablici 19.

Tablica 19. Učestalost pojedinih specifičnih protutijela u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-29 i u ispitanika u kontrolnoj skupini

Vrsta protutijela	Skupina AC-29 (N=142)	Kontrolna skupina (N=219)	p-vrijednost*
anti-dsDNA	46	32	**0,0001**
anti-SS-A (60kDa)	21	23	0,225
anti-TRIM21	17	31	0,551
anti-SS-B	11	16	0,877
anti-Sm	0	1	0,421
anti-U1-RNP	14	16	0,391
anti-Sm/RNP	1	6	0,171
anti-Scl-70	23	6	**<0,0001**
anti-Jo1	2	2	0,661
anti-CENP-B	0	12	**0,005**
anti-ribosomi	2	2	0,661
anti-histoni	3	11	0,162
anti-PmScl	5	13	0,304
anti-PCNA	4	17	0,050

*χ^2 test, vrijednosti < 0,05 ispisane su podebljanim brojevima

U ispitanika s ovim obrascem IF najčešća skupina dijagnoza bile su sistemske autoimunosne reumatske bolesti, prisutne u 34 ispitanika, upalne su artropatije bile nešto rjeđe, prisutne u 18 ispitanika, tumori su bili uputna dijagnoza u tri, a jetrene bolesti u dva ispitanika. Ovakva raspodjela skupina dijagnoza ne razlikuje se u odnosu na kontrolnu skupinu (p = 0,351; χ^2 test; Slika 80).



Slika 80. Udio pojedinih dijagnoza u ispitanika s obrascem imunofluorescencije AC-29 i u kontrolnoj skupini.

Slabo definirani obrasci imunofluorescencije

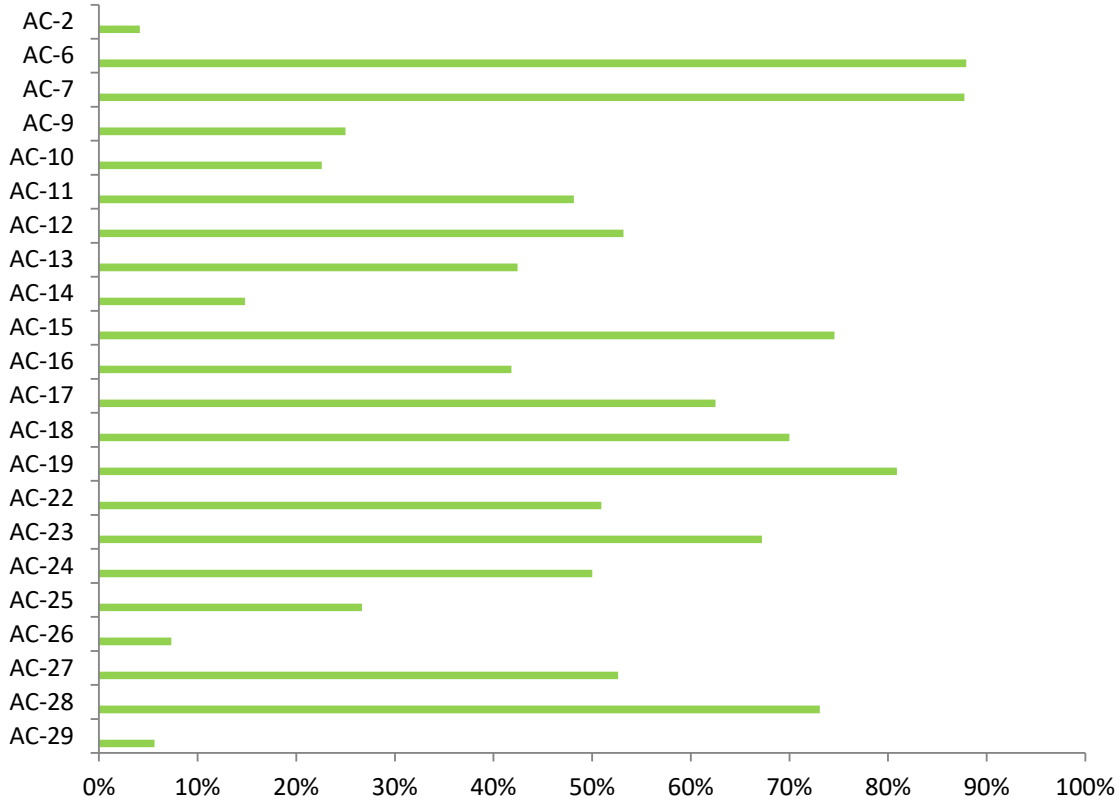
U dodatna 124 od ukupnih 4107 ANA-pozitivnih ispitanika evidentirani su obrasci fluorescencije koji se ne mogu klasificirati prema trenutačno važećem sustavu imenovanja, a koji se i međusobno znatno razlikuju. Ispitanici s ovim obrascima IF ne razlikuju se od kontrolne skupine ni po dobi ni po spolu, ali se (što je možda najvažnije) ne razlikuju niti po učestalosti nalaza nekog od najčešćih specifičnih protutijela koja su analizirana u ovoj studiji, a koja su otkrivena u 51 ispitanika iz ove skupine (41,13 %; p = 0,215; Fisherov test).

U 90 ispitanika iz ove skupine (72,58 %) riječ je bila o učestalom obrascu IF uz kojeg je bio dodatno prisutan i neki od ovih, do sada neklasificiranih obrazaca, a raspodjela učestalih obrazaca nalikovala je onoj u kontrolnoj skupini.

Niti po uputnim dijagnozama nije bilo velike razlike između tih ispitanika i onih u kontrolnoj skupini.

5.3. Učestali obrasci u kontekstu rijetkih obrazaca imunofluorescencije

U određenom broju ispitanika istodobno je s rijetkim obrascem IIF u uzorku uočena prisutnost i nekog od preostalih sedam učestalih obrazaca IIF. Udio ispitanika u kojih je bio prisutan takav nalaz znatno je varirao kod svakoga pojedinog rijetkog obrasca IF i kretao se od 4,13 % kod obrasca AC-2 pa sve do 87,93 % kod obrasca AC-6. Udjeli ispitanika s istodobnom prisutnošću nekog od učestalih obrazaca IF u pojedinim rijetkim obrascima IF prikazani su na Slici 81.



Slika 81. Udio ispitanika s istodobnom prisutnošću nekog od učestalih obrazaca imunofluorescencije (AC-1, AC-3, AC-4, AC-5, AC-8, AC-20, AC-21) među ispitanicima sa specifičnim rijetkim obrascima imunofluorescencije.

Među rijetkim obrascima IF kod kojih je opažena istodobna prisutnost učestalih obrazaca IF (to jest kod uzoraka s nekim od učestalih obrazaca IF i istodobno prisutnim pojedinim rijetkim obrascem IF), vrste i udjeli tih učestalih obrazaca su varirale.

Tako je u ispitanika s rijetkim obrascem **AC-6** uočen velik broj uzoraka s AC-21 obrascem koji je bio prisutan u 17 od 58 ispitanika (29,31 %), znatno češće nego u kontrolnoj skupini ($p < 0,0001$; Fisherov test). Istodobno, AC-1 je bio prisutan u samo 11 ispitanika, znatno rjeđe nego u kontrolnoj skupini ($p < 0,0001$; Fisherov test).

U ispitanika s istodobno prisutnim obrascem **AC-9**, među učestalim je obrascima prevladavao obrazac AC-4, prisutan u 13 od 18 ispitanika (72,22 %; $p = 0,001$; Fisherov test).

U ispitanika s obrascem **AC-11**, usprkos relativno malom broju, dokazana je povećana učestalost obrasca AC-3 u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0,004$; Fisherov test).

Među ispitanicima s učestalim obrascima IF i istodobno prisutnim obrascem **AC-12** bilo je neproporcionalno mnogo ispitanika s obrascem AC-21 ($n = 13$; $p < 0,0001$; Fisherov test), a malo ispitanika s obrascem AC-4 u odnosu na kontrolnu skupinu ($p = 0,004$; Fisherov test).

U ispitanika s učestalim obrascima IF u kojih je istodobno bio prisutan i obrazac **AC-15** postoji predominacija obrasca AC-4 ($n = 55$; $p = 0,038$; Fisherov test), dok su ostali učestali obrasci raspoređeni slično kao u kontrolnoj skupini.

Među učestalim obrascima s istodobno prisutnim obrascem **AC-18** češće se nego očekivano pojavljivao obrazac AC-5 ($n = 10$; $p = 0,0003$ u odnosu na kontrolnu skupinu).

Među čestim obrascima s istodobno prisutnim obrascem **AC-19**, obrazac AC-1 pojavljivao se rjeđe ($n = 75$; $p < 0,0001$; Fisherov test), obrazac AC-4 češće ($n = 122$; $p < 0,0001$), a AC-21 rjeđe ($n = 1$; $p = 0,004$).

Kod učestalih obrazaca s istodobno prisutnim obrascem **AC-22** uočena je predominacija obrasca AC-4 koji je bio prisutan u 16 ispitanika (59,25 %; $p = 0,005$; Fisherov test), dok je obrazac AC-1 bio nešto rjeđi ($n = 7$; 25,82 %; $p = 0,040$; Fisherov test).

U slučaju obrasca **AC-23**, među učestalim se obrascima najčešće radilo o obrascu AC-4 ($n = 20$; 48,78 %; $p = 0,030$; Fisherov test), a ostali su se obrasci pojavljivali u sličnim udjelima kao u kontrolnoj skupini.

U ispitanika s obrascem **AC-25**, neki od učestalih obrazaca nađeni su u malom broju ispitanika ($n = 8$; 26,67 %), a u čak polovine ispitanika radilo se o obrascu AC-8 ($p = 0,0006$; Fisherov test).

Obrazac **AC-26** najčešće se pojavljivao samostalno, a istodobna prisutnost učestalih obrazaca IF primijećena je u samo tri ispitanika (7,32 %), i to AC-3 u jednom te AC-21 u dva ispitanika ($p = 0,005$ u slučaju potonjeg u odnosu na kontrolnu skupinu; Fisherov test).

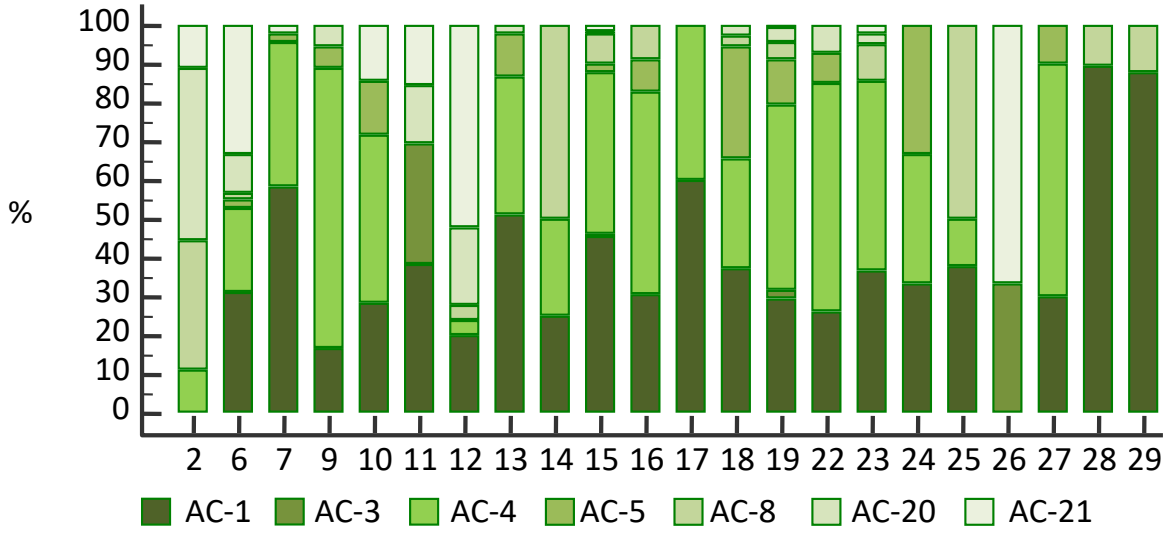
U slučaju obrasca **AC-27** najčešće je uočen obrazac AC-4, u šest ispitanika (6/10 s istodobnim učestalim obrascem, 60 %; $p = 0,078$; Fisherov test).

Kod obrasca **AC-28** u velikoj se većini ispitanika (17/19 s istodobnim učestalim obrascem; 89,47 %) radilo o obrascu AC-1 ($p = 0,0005$; Fisherov test).

U malobrojnih ispitanika s obrascem **AC-29** i istodobno prisutnim učestalim obrascem, skoro uvijek (sedam od osam ispitanika) radilo se o obrascu AC-1 ($p = 0,033$; Fisherov test).

Kod ispitanika s obrascem **AC-2, AC-7, AC-10, AC-13, AC-14, AC-16, AC-17 i AC-24** nisu zabilježene razlike u raspodjeli učestalih obrazaca u odnosu na kontrolnu skupinu, u nekim slučajevima moguće zbog malog broja istodobno prisutnih učestalih obrazaca, a u drugim zbog malog uzorka nekih od rijetkih obrazaca IF.

Udjeli pojedinih učestalih obrazaca IF s obzirom na istodobno prisutne rijetke obrasce IF prikazani su na slici 82.



Slika 82. Raspodjela pojedinih učestalih obrazaca imunofluorescencije unutar istodobno prisutnih rijetkih obrazaca imunofluorescencije.

Proporcija ispitanika s dokazanim specifičnim protutijelima razlikuje se između ispitanika s obrascem **AC-9** ovisno o istodobnoj prisutnosti učestalih obrazaca IF. U ispitanika kod kojih je istodobno prisutan i učestali obrazac, ona su pozitivna u 11/18 slučajeva (61,11 %), a kad je taj obrazac jedini prisutan, samo u 13/50 slučajeva (26 %; p = 0,011; Fisherov test).

U slučaju obrasca **AC-11** postoji slična situacija, s istodobno prisutnim učestalim obrascem IF protutijela su prisutna u 8/13 slučajeva (61,54 %), a u samo 2/11 slučaja (18,18 %) kad je AC-11 nađen kao samostalni (jedini) obrazac.

Specifična su protutijela pronađena u sva tri slučaja istodobne prisutnosti učestalog obrasca IF i obrasca **AC-26**, dok je kod izdvojenog (samostalnog) obrasca AC-26 učestalost specifičnih protutijela iznosila 35,71 % (10/28; p = 0,027; Fisherov test).

U slučaju obrasca **AC-29** specifična su protutijela bila prisutna u svih osam slučajeva s istodobnim nalazom učestalih obrazaca IF, što uprkos velikom postotku slučajeva nalaza samostalnog obrasca (78/134, 58,21 %) daje statistički bitnu razliku (p = 0,022; Fisherov test).

Kod ostalih rijetkih obrazaca IF nije zamijećena razlika u prisutnosti specifičnih protutijela u ovisnosti o istodobnoj prisutnosti učestalih obrazaca IF.

6. Rasprava

6.1. Demografske karakteristike ispitanika s rijetkim obrascima imunofluorescencije

Spol

U ispitanika s prisutnim ANA donekle je logično očekivati predominaciju ženskog spola, s obzirom na činjenicu da se ta protutijela najčešće povezuju sa sistemskim reumatskim autoimunosnim bolestima za koje je poznato da se učestalije javljaju kod žena (212). Ovakav obrazac spolne raspodjele uistinu je i primijećen u kontrolnoj skupini ispitanika u kojoj su ženski ispitanici bili višestruko brojniji od muških. S obzirom na to da kontrolna skupina uključuje ispitanike s obrascima IF koji se najčešće vezuju uz bolesti iz ovog spektra te da među njima s velikim udjelom sudjeluje homogeni obrazac fluorescencije (AC-1) koji se tradicionalno vezuje uz SLE (213), ovakva spolna raspodjela ne iznenađuje. S druge strane, u znatnog broja rijetkih obrazaca IF zamjećuju se nešto veći udjeli ispitanika muškog spola.

Kod nekih rijetkih obrazaca IF bilo je moguće dokazati razlike u spolnoj raspodjeli u odnosu na kontrolnu skupinu zbog njihove relativno veće učestalosti, ali je moguće da te razlike ne donose neke nove, klinički vrijedne spoznaje. Primjer za to je obrazac AC-19, asociran s protutijelima koja se učestalo nalaze u bolesnika sa SLE ili s antisintetaznim sindromom, što su bolesti s poznatom predilekcijom ženskog spola (212-214). S obzirom na to da je ovdje veći udio muških ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu, taj se rezultat može doimati neobičnim, ali je važno naglasiti da je i ovdje bila prisutna jaka predominacija ženskih ispitanika, samo manja nego u kontrolnoj skupini. Statističku je razliku bilo moguće dokazati zbog velikog broja uzoraka s tim obrascem IF i sukladno tome velike snage testa.

Kod nekih drugih obrazaca udio muških ispitanika približava se brojci od 50 %, kao kod AC-16, što je zbog toga bitna razlika usprkos malom broju ispitanika s tim obrascem. Za ovaj se obrazac povišena učestalost muških ispitanika može objasniti činjenicom da se on rijetko pojavljuje u kontekstu sistemskih autoimunosnih bolesti te stoga nema podloge za velik udio ženskih ispitanika (187). Još je kod nekoliko obrazaca IF zamijećen povišen udio muških ispitanika, kao što su AC-9, AC-15, AC-22 ili AC-25. Kod nekih je obrazaca također moguće da bi se takva razlika dokazala na većem broju ispitanika s obzirom na to da je i uz malen broj ispitanika razlika na granici statističke važnosti (kao npr. u obrasca AC-12). Jedini obrazac kod kojeg je primijećen apsolutno veći udio muških od ženskih ispitanika je obrazac AC-24 kod kojeg je, usprkos vrlo malom broju ispitanika (N=6), dokazana razlika u odnosu

na kontrolnu skupinu. Činjenica da se ovaj obrazac IF detektirao u dvotrećinskoj većini muških ispitanika pomalo začuđuje s obzirom na to da jedine bolesti s kojima se on povezuje jesu bolesti reumatskog spektra i karcinom dojke (203,204). Možda je moguće tu pojavu objasniti činjenicom da se taj obrazac povremeno može pojaviti i u osoba s raznim drugim stanjima. Tomu u prilog govori i raspodjela dijagnoza iz ove studije, prema kojoj dvije trećine ispitanika nije imalo niti jednu od promatranih skupina dijagnoza. Također je, usprkos statističkoj važnosti, moguće ipak da se radi o slučajnom učinku malog broja ispitanika. Niti kod jednog obrasca IF nije dokazan još veći udio ženskih ispitanika nego u kontrolnoj skupini, makar se tendencija uočava u ispitanika s obrascima AC-6 i AC-13. To ne čudi s obzirom na to da se prvi učestalo povezuje s dermatomiozitisom/polimiozitisom ili primarnim bilijarnim kolangitisom (164,165), a drugi u velikom udjelu sa SLE (179). Općenito se o spolnoj raspodjeli ispitanika s rijetkim obrascima IF može zaključiti da se oni, kao i u slučaju učestalih ANA, češće pojavljuju u žena, uz rijetke iznimke i uz napomenu da omjeri prisutnosti obaju spolova ipak u određenoj mjeri variraju.

Dob

Na dob ispitanika u kontrolnoj skupini (medijan dobi je bio 56 [IQR 43-67] godina) može utjecati činjenica da su ispitanici u velikom broju slučajeva (više od 50 %) upućivani na dokazivanje prisutnosti ANA bez jasne dijagnoze iz bilo koje od promatranih skupina dijagnoza, a još češće bez sumnje na sistemsku autoimunosnu bolest. Moguće je da se u određenom broju slučajeva radilo o neopravdano širokoj obradi osoba s određenim simptomima koji se mogu ili ne moraju vezati uz autoimunost te da je nalaz ANA bez jasne kliničke važnosti. Iz ove perspektive može se pretpostaviti da je medijan dobi svih ispitanika pomaknut na više nego što bi se moglo očekivati u ispitanika s autoimunosnim bolestima (215), ali s druge strane opravdan indicijama da prisutnost ANA raste s dobi unutar opće populacije (216). Imajući u vidu ova razmatranja, opaža se da se u svim slučajevima gdje je dokazana razlika u dobi između ispitanika s nekim obrascem IF i ispitanika kontrolne skupine radilo o nižoj dobi ispitanika s rijetkim obrascem IF. Osobito je zanimljiva činjenica da su ispitanici s AC-2 obrascem mlađi od ispitanika kontrolne skupine. S obzirom na to da prema dostupnim literaturnim izvodima prisutnost ovog obrasca, odnosno protutijela povezanih s tim obrascem, govori u prilog odsutnosti autoimunosne reumatske bolesti (132), moguće je da se u dijelu slučajeva radilo o mlađim ispitanicima koji su upućeni na ovu pretragu zbog

isključenja neke od tih bolesti, a da je njegova prisutnost ipak manja kod starijih osoba, osobito u svjetlu pojačane proizvodnje ANA u starijoj dobi neovisno o jasnom kliničkom značenju (216). Cajalova tjelešca, koja vizualiziramo obrascem AC-7, također su uočena u mlađih ispitanika, dijelom možda zbog povremenog pojavljivanja ovog obrasca u sistemskim autoimunosnim reumatskim bolestima, ali dijelom nerazjašnjeno s obzirom na još uvijek nepoznatu definitivnu etiologiju ovih protutijela (166,168). Kod obrasca AC-10 razlog za mlađu dob je jasniji s obzirom na njegovu učestalu povezanost sa sistemskom sklerozom, bolesti koja se često pojavljuje u mlađoj dobi (173,215). Slično objašnjenje vrijedi i za obrazac AC-13 koji se povezuje sa SLE (179). Slično kao i kod razlika u spolu, kod obrasca AC-24 se, usprkos iznimno malom broju ispitanika, naslućuje znatno niža dob, s medijanom od 33 godina. To se djelomično može objasniti postojanjem povezanosti sa sistemskim autoimunosnim bolestima, makar je ona slaba (203,204), ali preostaje činjenica da je u četiri od šest ispitanika zabilježen u mladih osoba u kojih nije postojala niti jedna od promatranih skupina dijagnoza. Ovaj se slabo razjašnjeni obrazac IF, čini se, pojavljuje češće u mlađih muških osoba. Općenito se može zaključiti da u ovom istraživanju nisu nađeni obrasci IF koji bi se eventualno češće pojavljivali u starijoj populaciji. Ispitanici s nekolicinom rijetkih obrazaca, često onih povezanih s bolestima reumatskog spektra, često su mlađi od uobičajenih ispitanika s dokazanim ANA.

6.2. Povezanost rijetkih obrazaca imunofluorescencije i specifičnih protutijela

6.2.1. Udjeli ispitanika s dokazanim specifičnim protutijelima

Kod nekih se obrazaca zamjećuju razlike u učestalosti nekog od specifičnih protutijela koja se mogu otkriti uz pomoć korištenog kompleta s predefiniranom mješavinom antigena. Za neke je obrasce manja učestalost ovakvih protutijela očekivana, posebice za obrazac **AC-2** koji se povezuje s protutijelima DFS70/LEDGF za koje se smatra da isključuju postojanje sistemske autoimunosne reumatske bolesti (132). Međutim, makar su pretraživana protutijela kod ovog obrasca otkrivena rjeđe, svejedno su prisutna u oko trećine svih slučajeva, s time da se ne radi o protutijelima DFS70/LEDGF (budući da ona nisu pretraživana), nego o nekom od protutijela koja se vezuju za sistemske autoimunosne bolesti. Moguće je da se ova proturječnost može dijelom objasniti činjenicom da ovaj obrazac ne jamči prisutnost protutijela DFS70/LEDGF u svim slučajevima (158). Niti prisutnost DFS70/LEDGF-specifičnog protutijela isključuje prisutnost još nekog protutijela čije smo prisustvo dokazali korištenom metodom. Zanimljivo je i primijetiti da je u sklopu ovog obrasca većina protutijela dokazana s učestalošću kao i u kontrolnoj skupini, s iznimkom protutijela anti-TRIM21, anti-CENP-B i anti-PCNA koja su ipak bila rjeđe prisutna. U svakom slučaju, prisutnost obrasca AC-2 zahtijeva daljnju analizu za dokaz specifičnih protutijela u jednakoj mjeri kao i prisutnost nekog od učestalih obrazaca IF kako bi se povećala klinička uporabljivost ovog obrasca.

Smanjena učestalost nekog od ovih protutijela u uzorcima s obrascem **AC-9** može se djelomično objasniti time da je taj obrazac najčešće povezan s protutijelima anti-U3RNP/fibrilarin koja su povezana sa sistemskom sklerozom (171), a koja se ne mogu otkriti korištenom metodom.

Slično vrijedi i za obrazac **AC-10** i uz njega pridružena protutijela anti-NOR90(hUBF), odnosno RNA polimeraza I (203).

Za smanjenu učestalost nekog od ovih protutijela u ispitanika s obrascem **AC-15** podloga je njegov rijetki nalaz u ispitanika sa sistemskim autoimunosnim reumatskim bolestima (217).

Kod obrasca **AC-22** protutijela su usmjerena na antigene Golgijeva tjelešca (199), što objašnjava manji udio pozitivnih protutijela dokazanih ovom metodom. Svejedno, njihova prisutnost u određenom udjelu nameće pitanje, u odsutnosti drugih obrazaca fluorescencije,

kako dolazi do nakupljanja fluorescentnog signala u području te organele u kontekstu protutijela koja ne bi trebala reagirati s antigenima u tom području.

Slična se pitanja mogu postaviti i u slučaju obrasca **AC-25**, s obzirom na to da on podrazumijeva protutijela na antigene diobenog vretena (206).

U svim do sada spomenutim slučajevima radilo se o smanjenom udjelu specifičnih protutijela otkrivenih ovom metodom. Međutim, kod nekih je rijetkih obrazaca IF naglašeno velik udio ispitanika s detektiranim protutijelima. Za obrazac **AC-13** ova pojava naizgled ne začuđuje, s obzirom na njegovu udruženost s protutijelima anti-PCNA (218) povezanim sa SLE. Međutim, u ovom su istraživanju protutijela koja su odgovorna za ove visoke postotke mahom bila anti-SS-A (60kDa), anti-TRIM21 te anti-SS-B, dok su protutijela anti-PCNA bila prisutna u sličnim omjerima kao i u kontrolnoj skupini. Razlog za ovu pojavu nije poznat, makar je poznato da i protutijela na neke druge antigene mogu biti odgovorna za obrazac IF nalik AC-13 (219). Dodatno objašnjenje jest da je ovaj obrazac moguće zamijeniti s mješovitim obrascem više učestalih obrazaca IIF koji bi u tom slučaju bili odgovorni za nalaz specifičnih protutijela.

Kod obrasca **AC-19** poznato je da je povezan sa SLE i s anti-sintetaznim sindromom, pa u prvi mah ne čudi visok postotak pozitivnih protutijela, ali je ipak donekle neobično s obzirom na to da se odgovornim za ovaj obrazac smatraju protutijela na antigene koji nisu uključeni u korištenu predefiniranu mješavinu antigena (220).

Obrazac **AC-29** je jedinstven jer je kompozitni obrazac, odnosno zahtijeva ispunjavanje specifičnog skupa kriterija da bi se mogao proglasiti prisutnim. Smatra se visoko specifičnim za prisutnost protutijela na DNA topoizomerazu I (157). Ova su protutijela (anti-Scl-70) uistinu odgovorna za velik broj ovih slučajeva te vjerojatno pridonose činjenici da je udio ispitanika s pozitivnim specifičnim protutijelima veći od onog u kontrolnoj skupini. Međutim, i u ovom se obrascu može primijetiti prisutnost raznih drugih protutijela, od čega je osobito zanimljiva veća učestalost protutijela anti-dsDNA u odnosu na kontrolnu skupinu, moguće kao posljedica istodobno prisutnog obrasca AC-1, odnosno mješovitog obrasca AC-1/AC-29.

Od obrazaca kod kojih je prisutnost protutijela slična kao u kontrolnoj skupini vrijedi izdvojiti obrazac **AC-23** koji bi trebao (prema literaturnim podacima) biti prisutan samo u odabranih ispitanika s hepatitisom C koji su liječeni određenim lijekovima te koji se smatra

primjerom protutijela induciranih lijekovima (200,201). Stoga čudi učestala prisutnost brojnih protutijela koja ne bi trebala rezultirati ovim obrascem IF. Treba uzeti u obzir da se određen broj tih protutijela može protumačiti istodobnom prisutnošću učestalih obrazaca IF.

6.2.2. Pojavnost pojedinih specifičnih protutijela u rijetkim obrascima imunofluorescencije

U ovom će se odjeljku razmatrati povezanost pojedinih specifičnih protutijela s pojedinim rijetkim obrascima IF.

Protutijela **anti-dsDNA** u reumatologiji su postala sinonim za dijagnozu SLE zbog svoje visoke specifičnosti. Najčešće se metodom IIF izražavaju homogenim obrascem IF (221). Zanimljivo je stoga da niti kod rijetkih obrazaca IF ne smijemo zanemariti mogućnost pojave ovih protutijela, pa tako i u slučaju obrasca AC-2 bez istodobno prisutnih drugih obrazaca IF, što s obzirom na dosadašnje spoznaje o ovom obrascu ne bi trebao biti slučaj (132). Kod većine su ovih obrazaca protutijela anti-dsDNA nađena sa sličnom frekvencijom kao i u kontrolnoj skupini ispitanika s učestalim obrascima, a manje ih je jedino bilo kod obrasca AC-10 koji se povezuje s protutijelima na RNA-polimerazu I u kontekstu sistemske skleroze (222). Relativno veći udio ovih protutijela dokazan je u uzorcima s obrascem AC-19 koji se povremeno viđa u ispitanika sa SLE, ali se smatra da su tada odgovorna protutijela na ribosomske P bjelančevine (223). Također ih je više kod obrasca AC-29, što iznenađuje jer je ovaj obrazac izdvojen kao visoko specifičan za protutijela na DNA topoizomerazu I (157).

Protutijela **anti-SS-A**, nedavno razdvojena prema molekularnoj masi na anti-SS-A (60 kDa) i anti-SS-A (52 kDa) (TRIM 21) te protutijela **anti-SS-B**, tradicionalno se povezuju s dijagnozom Sjögrenova sindroma, ali i SLE (86), a u velikom su udjelu također zabilježena u većini rijetkih obrazaca IF. Zanimljivo je primijetiti da se ponekad učestalosti pojavljivanja nekog od ova tri protutijela međusobno neovisno razlikuju od kontrolne skupine, što se u slučaju oba protutijela iz skupine SS-A može objasniti činjenicom da su, za razliku od prijašnjih teza, ovi antigeni međusobno neovisni (224). Međutim, kod nekih se obrazaca IF može dobiti dojam da učestalost sva tri protutijela iz ove skupine ima međusobno sukladno kretanje (ali ne u svim slučajevima), a da je ponegdje izostao statistički dokaz za pojedino protutijelo.

Pri tome su razlike u učestalosti u odnosu na kontrolu skupinu najizraženije u slučaju protutijela anti-TRIM21, koje se kod čak sedam rijetkih obrazaca IF statistički značajno razlikuju u odnosu na kontrolnu skupinu. Najčešće se radi o smanjenoj učestalosti, u 4 od 5 slučajeva izdvojeno od druga dva protutijela ove skupine. Takav je slučaj kod obrazaca AC-2, AC-11 (koji je ionako slabo povezan sa sistemskim autoimunosnim dijagnozama) (176), AC-23 (povezanog s upotrebom lijekova u ispitanika s hepatitisom C (200)) i AC-26 (gdje učestalo postoji povezanost s autoimunosnim sistemskim bolestima (205)). Uz smanjen omjer pojavljivanja anti-TRIM21 protutijela u obrascu AC-11, zanimljivo je primijetiti kako su se anti-TRIM21 te anti-SS-A protutijela rjeđe pojavljivala u obrascu AC-15. Oba ova obrasca su se češće pojavljivala u skupini jetrenih bolesti te ostaje za istražiti možemo li na temelju njih pretpostaviti o kojoj se autoimunosnoj jetrenoj bolesti radi.

Samo u jednom slučaju pojavnost protutijela anti-SS-B je bila različita od kontrolne skupine neovisno o SS-A protutijelima, i to u slučaju obrasca AC-18, gdje je bila češća, što nije lako objasniti u kontekstu nejasne povezanosti ovog obrasca s kliničkim entitetima.

Od obrazaca kod kojih je više protutijela iz ove skupine bilo znatno više u odnosu na kontrolnu skupinu izdvaja se obrazac AC-13, što je neobično zbog prema literaturi jake povezanosti ovog obrasca s antigenom PCNA (179). Moguće da se u dijelu ovih slučajeva radi o vrlo recentno izdvojenom obrascu AC-4a u kombinaciji s nekim neklasificiranim i nepoznatim obrascem ili samo različitim epitopom istog PCNA antigena. Kao i u slučaju protutijela anti-dsDNA, višak protutijela iz skupine SS-A kod ispitanika s obrascem AC-19 može se objasniti njegovom povezanošću sa SLE. Nadalje, antigen Ro52, za razliku od Ro60, je smješten u citoplazmi, te daje na standardnim HEp-2 preparatima obrazac AC-19 (78). Još jedno, dodatno vrijedno objašnjenje pojave protutijela anti-SS-A u raznim obrascima IIF jest činjenica da je antigen Ro60 načelno slabo dostupan na standarnim preparatima HEp-2 te sukladno tomu sam za sebe najčešće ne rezultira bilo kakvim pozitivnim obrascem fluorescencije, a fluorescencija kod uzoraka s ovim protutijelima najčešće je rezultat nekoga drugog istodobno prisutnog protutijela (225).

Protutijela **anti-Sm** dokazana su samo sporadično u rijetkim obrascima IF, a s obzirom na to da je sličan nalaz bio i u kontrolnoj skupini (dokazana u samo jednog ispitanika), nije bilo razlika koje bi govorile u prilog specifičnosti pojedinog obrasca IF s obzirom na učestalost ovog protutijela. S obzirom na male brojeve tih protutijela, ne može se u potpunosti isključiti mogućnost postojanja eventualnih razlika koje bi se dokazale na većim uzorcima.

Protutijela koja se često razmatraju zajedno s protutijelima anti-Sm, protutijela **anti-U1-RNP** (65), bila su u nešto većim brojevima prisutna u većini rijetkih obrazaca IF, ali su razlike u odnosu na kontrolnu skupinu dokazane samo kod obrazaca AC-7 i AC-18. U prvom slučaju to dovodi u pitanje tezu prema kojoj je obrazac AC-7 slabo povezan s bilo kojom bolešću (167) s obzirom na to da su ova protutijela učestalo vezana uz SLE i neizostavna u klasifikaciji MCTD (102), a baca i novo svijetlo na obrazac AC-18 za kojeg nisu posve razjašnjene kliničke implikacije (191).

Za razliku od prethodnog protutijela na odvojeni antigen U1-RNP, protutijela usmjerena na kompleks **Sm/RNP** nisu se pojavljivala rjeđe ili češće niti u jednom rijetkom obrascu IF u odnosu na kontrolnu skupinu.

Očekivano, protutijela na topoizomerazu I (**anti-Scl70**) mnogo su češće detektirana u slučaju obrasca AC-29, definiranog u svrhu bolje detekcije tog protutijela (157). Sporadično su se pojavljivala i u drugim rijetkim obrascima. Budući da je njegova pojava sporadična i u kontrolnoj skupini, nisu dokazane razlike u njihovim frekvencijama.

Protutijela povezana s dermatomiozitisom i polimiozitisom (u slučaju korištene metode samo **anti-Jo1**) (109) pojavljivala su se samo sporadično te se na temelju rezultata ovog istraživanja ne može govoriti da bi neki rijetki obrazac IF bio karakterističan za upalne miopatije povezane s ovim protutijelom. Ipak, ranija literatura preporučuje razmatranje ovih dijagnoza u ispitanika s obrascem IIF AC-19 ili AC-20 (193).

Protutijela na **CENP-B**, inače snažno povezana s učestalim obrascem AC-3, u velikom se broju rijetkih obrazaca ne javljaju različito u odnosu na kontrolnu skupinu, što upozorava na to da ta protutijela nisu visoko specifična za obrazac AC-3. Navedena tvrdnja vjerojatno ne vrijedi u drugom smjeru. Ipak, u nekoliko rijektih obrazaca IF ova se protutijela pojavljuju rjeđe (AC-2, AC-9, AC-15, AC-19, AC-29), što govori protiv njihove povezanosti s centromernim antigenima.

Protutijela usmjerena na **ribosome** bila su općenito vrlo rijetka te se na temelju ovih rezultata ne može govoriti o njihovoj povezanosti, bilo pozitivnoj ili negativnoj s nekim od rijetkih obrazaca IF. Očekivano važna je iznimka obrazac AC-19 gdje su ta protutijela zabilježena puno češće u odnosu na kontrolnu skupinu. S obzirom na to da je ovaj obrazac povezan s antigenima iz spektra ribosomskih P bjelančevina, ovo nije iznenađujuće (220).

Nalaz koji svakako nije očekivan je učestala pojavnost protutijela na **histone** kod ovog obrasca budući da se ovaj citoplazmatski obrazac IF ne bi trebao pojavljivati u slučaju antigena prisutnog u jezgri stanice (226). Kod ostalih obrazaca IF ova su se protutijela pojavljivala relativno rijetko, slično kao i u kontrolnoj skupini.

Za protutijela **anti-PmScl** nisu nađeni dokazi koji bi govorili o povezanosti s nekim rijetkim obrascem IF, bilo u smislu rjeđeg, bilo češćeg pojavljivanja.

Kod protutijela **anti-PCNA** moglo bi se očekivati da će biti prisutna veoma učestalo kod obrasca AC-13 koji se smatra vezanim za ova protutijela (218). Međutim, u ovom obrascu ona se pojavljuju s jednakom učestalošću kao u kontrolnoj skupini, a pojavljuju se i u drugim rijetkim obrascima IF, rjeđe jedino u slučaju po mnogim pitanjima specifičnog obrasca AC-2. Je li objašnjenje ove pojave u mješovitim obrascima različitih titara teško je tvrditi.

Valja napomenuti da su neki obrasci IF detektirani toliko rijetko da nije bilo moguće smisleno analizirati njihovu eventualnu povezanost sa specifičnim protutijelima. Takve se asocijacije mogu detektirati u nekim budućim, ciljanim, višegodišnjim praćenjima tih obrazaca uz senzibilizaciju laboratorijskog osoblja na potrebu za njihovim bilježenjem i izvještavanjem.

U svakom slučaju, činjenica da se kod većine rijetkih obrazaca IF mogu detektirati specifična protutijela govori da se tim obrascima po uočavanju treba pridati jednaka pozornost kao i kad se radi o nekom od učestalih obrazaca te bi stoga prema načelima refleksnog testiranja (227) nakon IIF na HEp-2 stanicama trebalo proširiti dijagnostiku nekim od testova koji detektiraju prisutnost manjega ili većeg skupa najučestalijih klinički relevantnih specifičnih protutijela povezanih s danim obrascem. S obzirom na inherentna ograničenja ovakve vrste testova, uključujući i onaj korišten za detekciju specifičnih protutijela u sklopu ovog istraživanja, a koje se ponajprije odnose na limitirani predefinirani izbor mogućih protutijela, ograničena je mogućnost adekvatne evaluacije svih specifičnih protutijela u pojedinom uzorku s rijetkim obrascem IF. S jedne strane, za mnoge takve obrasce postoji povezanost s protutijelima koja nisu uključena niti u jedan komercijalni komplet antigena te izostaje mogućnost njihove evidencije izvan konteksta znanstveno-istraživačkog rada. Moguće je da su prisutna u nekim od uzoraka u kojih nisu dokazana specifična protutijela ovom metodom. S druge strane, i u uzorcima s rijetkim obrascima IF kod kojih su detektirana neka od protutijela postoji pitanje

istodobne prisutnosti i nekog od protutijela koja za sada ostaju izvan dosega rutinske detekcije.

Neka od detektiranih protutijela iz korištenog kompleta možebitno rezultiraju istodobno prisutnim učestalim obrascem IF, dok za promatrani rijetki obrazac može biti odgovorno neko drugo protutijelo koje nije uključeno u korišteni detekcijski panel. Međutim, učestala protutijela često se očigledno nalaze i u uzorcima kod kojih je rijetki uzorak IF jedini prisutan, a za koji nije poznata veza koja bi objasnila prisutnost nekog od tih učestalih protutijela s obzirom na to da se ne poklapaju s antigenima za koje se smatraju da su meta protutijela kod pojedinih rijetkih obrazaca IF. Može se zaključiti da i u slučaju učestalih obrazaca i u slučaju rijetkih ne postoji ekskluzivna uzajamnost između nekog para obrazac IF – protutijelo, već se radi samo o manjoj ili većoj povezanosti pojedinih kombinacija ovih dvaju parametara. S obzirom na to da se može pretpostaviti da je svako specifično protutijelo monospecifično za određeni antigen, moguće je da u nekim slučajevima budu detektirani drugačiji obrasci IF od očekivanih jer je raspodjela pojedinih antigena različita među pojedinicima ili ovisna o pridruženim bolestima ili stanjima. Alternativno objašnjenje bila bi eventualna križna reaktivnost između nepoznatih protutijela u uzorku i nekih antigena koji se nalaze u predefiniranom detekcijskom setu. S obzirom na brojnost staničnih antigena koji mogu izazvati stvaranje protutijela, a koji mogu više ili manje nalikovati tim predefiniranim antigenima, ta će se mogućnost, koliko god bila mala, teško moći u potpunosti ukloniti.

6.2.3. Istodobna prisutnost više vrsta protutijela

Kod većine rijetkih obrazaca IF protutijela su najčešće bila pojedinačna (solitarna), uz sve manju učestalost ispitanika kako raste broj istodobno prisutnih vrsta specifičnih protutijela. Iznimku čine dva obrasca kod kojih su vrlo učestalo istodobno bila prisutna mnoga protutijela. Prvi je obrazac AC-13, smatran specifičnim za antigen PCNA (218), ali kod kojeg pleomorfni fluorescencijski signal moguće govori o istodobnoj reaktivnosti na više različitih antigena različite unutarstanične lokalizacije. Drugi je obrazac AC-19 kod kojeg homogen, maglovit signal fluorescencije u citoplazmi (196) također možda skriva više antigena koji vežu protutijela prisutna u serumu.

6.3. Povezanost rijetkih obrazaca imunofluorescencije i kliničkih dijagnoza

Pojam ANA tradicionalno se, s dobrim razlogom, najviše povezuje s dijagnozama sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti u kojih su neizostavan dio dijagnostičke obrade. Sukladno tomu, od velikog je interesa bilo utvrditi jesu li te dijagnoze povezane samo s pojedinim učestalim obrascima IF ili je na neku od tih dijagnoza opravdano posumnjati i u slučaju nalaza nekog od manje učestalih obrazaca IF. Dodatnu težinu potrebi za evaluacijom ovih dijagnoza daju ranije opisani rezultati po kojima se specifična protutijela, u predefiniranoj mješavini izabranoj mahom prema poznatim vezama s nekom od ovih bolesti, učestalo pojavljuju i u većine tih rijetkih obrazaca IF. Rezultati govore u prilog tome da je uistinu potrebno razmotriti ove dijagnoze u ispitanika s dobivenim pojedinim rijetkim obrascem IF. Nasuprot tome, ako je ispitanik s kliničkom sumnjom na neku od ovih bolesti upućen na dijagnostiku ANA, pozitivan IF nalaz može govoriti u prilog toj dijagnozi i u slučaju izostanka nekog od obrazaca naglašeno povezanih s nekom od tih bolesti, kao što je homogeni obrazac IF. Naravno, postoje neke iznimke, odnosno neki obrasci IF kod kojih su se ove dijagnoze pojavljivale rjeđe. Očekivano, jedan od tih obrazaca mogao bi biti obrazac AC-2, ali se radi tek o granično važnoj razlici u odnosu na kontrolnu skupinu. S obzirom na relativno velik uzorak ispitanika s tim obrascem IF, apsolutna veličina te razlike nije odviše velika, pa to dovodi u pitanje korištenje isključivo tog obrasca kao isključnog kriterija neke od sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti. Moguće je da je u tu svrhu uistinu nužno odrediti i prisutnost protutijela anti-DFS70/LEDGF, čija se prisutnost uz odsutnost drugih specifičnih protutijela dobro asociranih sa sistemskim autoimunosnim reumatskim bolestima smatra biljegom odsustnosti tih bolesti (132). S druge strane, učestalost ovih dijagnoza bila je znatno manja kod obrazaca AC-22, AC-23 i AC-27 već i na malom promatranom uzorku. Štoviše, kod obrasca AC-27 nije bilo niti jednog ispitanika s dijagnozom sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti, što bi moglo govoriti o dobrim karakteristikama ovog obrasca za isključivanje dijagnoze ovih bolesti. Za obrazac AC-22 već su i ranija istraživanja naznačila rijetku povezanost sa sistemskim autoimunosnim reumatskim bolestima (228). U slučaju obrasca AC-23 manjak ispitanika s ovom skupinom dijagnoza mogao bi se objasniti njegovom poznatom povezanošću s farmakoterapijom hepatitisa C (200). Treba napomenuti da se čini da specifičnost povezanosti obrasca AC-23 i farmakoterapije hepatitisa C nije visoka kao što se do sada smatralo, s obzirom na to da je kod ovog obrasca učestalo

detektirana prisutnost protutijela povezanih s reumatskim bolestima iako su se dijagnoze iz skupine sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti pojavljivale rjeđe.

U slučaju dvaju rijetkih obrazaca primijećena je povišena učestalost uputnih dijagnoza u okviru sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti. Kod obrasca AC-13 to je objašnjivo njegovom povezanošću sa SLE (218), ali sudeći prema ranije obrađenim rezultatima raspodjele specifičnih protutijela, očito ne isključivo preko protutijela anti-PCNA. U slučaju obrasca AC-18, ovaj je rezultat važan jer do sada nije utvrđena njegova jasna povezanost s nekom od skupina dijagnoza (191). Usprkos navedenim rezultatima, ne čini se da bi analiza dijagnostičke vrijednosti bilo kojeg od ovih obrazaca IF, uključujući AC-2, verificirala veoma visoku osjetljivost i specifičnost za dijagnostiku sistemskih autoimunosnih reumatskih bolesti.

Upalne artropatije još su jedna od skupina bolesti kod kojih se ispitanici učestalo upućuju na dijagnostiku ANA. U velikom broju slučajeva vjerojatno se upućuju u svrhu diferencijacije u odnosu na sistemske bolesti autoimunosne geneze koje se ponekad mogu očitovati pretežno sličnim simptomima. Prema dobivenim rezultatima, čini se da analiza obrazaca fluorescencije ne može pridonijeti procjeni vjerojatnosti prisutnosti neke od ovih kliničkih dijagnoza s obzirom na to da se ove dijagnoze pojavljuju u sličnim proporcijama ispitanika u svim obrascima IF, i rijetkim i onima u kontrolnoj skupini. Moguće je da se ove dijagnoze pojavljuju rjeđe jedino kod obrazaca AC-9 i AC-11 kod kojih se statističkom analizom pokazuje ta tendencija.

Dijagnoze jetrenih bolesti tradicionalno se ne povezuju uz pojavu ANA, s iznimkom učestalog obrasca AC-21 (AMA) koji je jasno povezan s PBC-om (197). Moguće je da bi se takav stav trebalo modificirati jer postoji nekolicina obrazaca kod kojih su ove bolesti bile uputna dijagnoza znatno češće nego u kontrolnoj skupini. Za neke od ovih obrazaca ova je povezanost od ranije poznata, ponajprije za obrazac AC-6 kod kojeg je zamijećena povezanost s PBC-om kroz nekoliko odgovornih antigena, odnosno protutijela koja se za njih vežu (165), obrazac AC-11 kojeg se povezuje s autoimunosnim bolestima jetre (176), obrazac AC-12 koji se povremeno vidi u ispitanika s PBC-om (177) te obrazac AC-15 koji se nalazi i u ispitanika s autoimunim hepatitisom tipa 1 i ispitanika s infekcijom virusom hepatitisa C (182). Kod obrasca AC-17 također je poznato da se pojavljuje u oko 40 % ispitanika s autoimunim hepatitisom (229), ali do sada nije analizirana učestalost takvih bolesti kod ispitanika s tim obrascem. Prema viđenome, ta se učestalost čini velikom s obzirom na to da

su bolesti iz ove skupine bile uputne dijagnoze u čak tri od osam ispitanika s ovim obrascem čije bi pojavljivanje u rutinskoj dijagnostici trebalo pobuditi sumnju na prisutnost jetrene patologije. Za obrazac AC-22 zna se da se sporadično pojavljuje kod različitih dijagnoza (129), ali prema dostupnoj literaturi među njima se ne izdvajaju jetrene, koje su u ovom istraživanju bile češća uputna dijagnoza u ispitanika s ovim obrascem. S druge strane, za obrazac AC-23 očekivao bi se veliki udio jetrenih bolesnika, specifično ispitanika s hepatitisom C liječenim određenim lijekovima (200). Međutim, u ovom radu to nije bio slučaj, već su dijagnoze promatranih jetrenih bolesti nađene u sličnim proporcijama kao i kod učestalih obrazaca IF. Objašnjenje za to moguće leži u činjenici da u skupini jetrenih bolesti nisu uključene MKB dijagnoze B15-B19. Još jedna zanimljivost jest granično povećan udio ispitanika s ovim bolestima među ispitanicima s obrascem AC-2. Međutim, s obzirom na velik broj ispitanika ta razlika, ako i postoji, vjerojatno nije velika niti klinički bitna. Moguće je da je dijelom rezultat smanjenog udjela ispitanika s autoimunosnim reumatskim bolestima s ovim uzorkom što znači i veći udio ispitanika s drugim, pa tako i jetrenim bolestima u kojih je pronađen ovaj uzorak IF. S obzirom na malen broj ispitanika s ovim dijagnozama u kontrolnoj skupini, nije bilo realno očekivati dokaz još rjeđeg pojavljivanja ove vrste bolesti u nekom od obrazaca IF.

S obzirom na dugoročne implikacije, otkrivanje eventualnog obrasca IF koji bi govorio u prilog postojanju tumorskog procesa u organizmu bilo bi iznimno važno jer bi moglo u određenim slučajevima dovesti do otkrivanja takve bolesti i prije kliničke manifestacije. U slučaju obrasca AC-16, kod kojeg su u većem udjelu nađene takve dijagnoze u odnosu na kontrolnu skupinu, postoje sporadični izvještaji prema kojima su protutijela odgovorna za ovaj obrazac uočena u ispitanika s karcinomom nazofarinksa (230) ili kod tumora povezanih s neurofibromatozom tipa 1 (187). No, nema spoznaja o eventualnim učestalim tumorima ili izvještaja o ukupnim proporcijama takvih bolesnika među ispitanicima s ovim obrascem IF. Za obrazac AC-12, kod kojeg je također uočena povišena učestalost takvih ispitanika s dijagnozom maligniteta, u literaturi do sada nije opisivana veza s bilo kakvom tumorskom bolesti. Za obrazac AC-27 razlike u zastupljenosti dijagnoze tumorske bolesti bile su granične u odnosu na kontrolnu skupinu, ali moguće zbog malog uzorka jer postoje izvještaji o nalazu protutijela odgovornih za ovaj obrazac kod nekih malignih bolesti (208). U ovom istraživanju nije dokazana povezanost tih dijagnoza s obrascem AC-14 za koji su ranije postojali takvi izvještaji (231), moguće zbog malog uzorka ili zbog moguće ovisnosti o titru ovih protutijela. Također, moguće je da tumorski procesi postoje u nekih od ispitanika s ovim

obrascem IIF, ali se još nisu klinički očitovali pa nisu niti dijagnosticirani. S obzirom na malu učestalost ovih dijagnoza u bilo kojem obrascu IF, i čestom i rijetkom, nije vjerojatno da se dijagnostika ANA može upotrijebiti u dijagnostičkom procesu bilo koje tumorske bolesti.

6.4. Rijetki obrasci u kontekstu učestalih obrazaca imunofluorescencije

Pri analizi istodobne prisutnosti učestalih obrazaca IF u ispitanika s nekim od rijetkih obrazaca IF naznačena je raznolikost učestalosti čestih obrazaca koja se kreće od samo nekoliko slučajeva, kao kod obrazaca AC-2 ili AC-29, pa do gotovo univerzalne prisutnosti u obrascima AC-6 ili AC-7. Osobito je važna činjenica da se kod obrasca AC-2 drugi obrasci IF pojavljuju jako rijetko, ponajprije zbog toga što se značajke koje se pripisuju tom obrascu, odnosno odgovarajućim protutijelima, ne smatraju važećima ako je prisutan i neki drugi obrazac IF (158), a što nije čest slučaj. Ova spoznaja omogućuje i bolju kontekstualizaciju ranije obrađenih rezultata koji govore o učestaloj prisutnosti raznovrsnih specifičnih protutijela u uzorcima s ovim obrascem IF, a koja se na ovaj način može pripisati povezanošću s tim obrascem, a ne nekim eventualnim sinkrono prisutnim. Za obrazac AC-29 razlog zapažene istodobne male učestalosti nekog od čestih obrazaca proizlazi iz specifičnog sastava tog obrasca od više različitih komponenti (157) koje bi se u drugim obrascima možda definirale kao istodobno prisutni drugi obrasci fluorescencije. Kod obrazaca AC-6 i AC-7, koji se sastoje od različitog broja jezgrenih točaka fluorescencije, velika istodobna učestalost drugih obrazaca IF govori o tendenciji da se te točke u najvećem broju slučajeva primijete superponirane na neki uobičajeni obrazac.

Kod nekih rijetkih obrazaca IF drugi su, česti obrasci IF prisutni toliko rijetko da to ne dopušta daljnju karakterizaciju tih „mješovitih“ obrazaca IF. Takav je problem postojao i kod rijetkih obrazaca kojih je bilo toliko malo da nije bilo moguće smisleno provesti analizu istodobno prisutnih učestalih obrazaca IF. Ipak, analiza udjela učestalih obrazaca fluorescencije u slučajevima istodobne prisutnosti pojedinih rijetkih obrazaca fluorescencije bila je moguća. Iz ove je analize vidljivo da je najveći broj rijetkih obrazaca IF povezan s istodobnom prisutnošću jezgrenog obrasca AC-4, i to uglavnom citoplazmatskih obrazaca (AC-15, AC-19, AC-22, AC-23), uz iznimku nukleolarnog obrasca AC-9 i mitotskog obrasca AC-27. Veza s obrascem AC-9 eventualno bi se mogla objasniti preko zajedničke povezanosti sa sistemskom sklerozom (171), a s AC-19 preko veze s određenim

autoimunosnim upalnim miopatijama (162). Za ostale rijetke obrasce u ovom kontekstu nema zadovoljavajućeg objašnjenja. Također je uočena i povezanost nekoliko rijetkih obrazaca IF s obrascem AC-21, citoplazmatskim obrascem povezanim s PBC-om (197). Za obrazac AC-6 ova je povezanost i ranije uočena, osobito u kontekstu ove bolesti, a njihova istodobna prisutnost je od dijagnostičkog značenja (165). Slično se može objasniti i povezanost AC-21 s AC-12 koji se isto smatra učestalijim u PBC-u (232). S druge strane, razlog povezanosti obrasca AC-21 i obrasca AC-26 nije u potpunosti jasan, niti za to postoji objašnjenje u literaturi. Povezanost obrazaca AC-1 i AC-29 mogla bi se objasniti time što AC-1 nije dio potrebnih kriterija koji moraju biti ispunjeni da bi se dijagnosticirao obrazac AC-29 te time AC-1 postaje prevladavajući učestali obrazac (istodobno prisutni obrazac AC-4 ubraja se u dio kriterija za obrazac AC-29) (157). Veza obrasca AC-1 i mitotičkog obrasca AC-28 nije do sada opisana u literaturi. Povezanost obrazaca AC-3 i AC-11 moguće leži u njihovoj zajedničkoj povezanosti sa sistemskom sklerozom, iako se radi o različitim fenotipovima te bolesti (176,181). Razlog eventualne povezanosti obrazaca AC-5 i AC-18 ne može se zadovoljavajuće objasniti, kao niti veza obrazaca AC-8 i AC-25. Iz svega je očito da u području istodobno prisutnih obrazaca IF postoji još mnogo nepoznanica koje zbog rijetke pojave ovih situacija u rutinskoj dijagnostici neće biti lako riješiti.

S obzirom na istodobnu pojavu učestalih obrazaca IF, koja kod nekih rijetkih obrazaca IF premašuje 50 % slučajeva, opravdano je upitati se jesu li raniji rezultati prisutnosti specifičnih protutijela rezultat samih rijetkih obrazaca IF ili su povezani s istodobno prisutnim učestalim obrascem IF. U tu svrhu učinjena je analiza razlike u proporcijama uzoraka s prisutnim specifičnim protutijelima za svaki rijetki obrazac IF u kojoj su uspoređivane skupine takvih ispitanika gdje je rijetki obrazac solitaran i ispitanika gdje je prisutan i učestali obrazac IF. Samo je u par slučajeva primijećena veća proporcija ispitanika sa specifičnim protutijelima kod istodobne prisutnosti učestalih obrazaca IF, i to za obrasce AC-9, AC-11, AC-26 i AC-29. U slučaju obrazaca AC-26 i AC-29 radi se o velikoj učestalosti prisutnosti tih protutijela u inače maloj skupini ispitanika unutar tih rijetkih obrazaca, a kod kojih je istodobno detektiran i učestali obrazac IF. Ovi rezultati govore da se rezultati prisutnosti specifičnih protutijela trebaju uzeti s rezervom kod obrazaca AC-9 i AC-11, te u manjoj mjeri AC-26 i AC-29, dok se za ostale obrasce ti rezultati čine reprezentativnima te isključivom posljedicom rijetkih obrazaca IF odnosno protutijela koja ih izazivaju.

6.5. Ograničenja studije i buduće perspektive

Moguća ograničenja ove studije proizlaze ponajprije iz subjektivnosti ove metode koja je neizbježna s obzirom na način izvođenja pretrage. No, subjektivnost procjene uvelike je smanjena međunarodnim aktivnostima koje su poduzete u svrhu standardizacije izvještavanja o dobivenim nalazima. Usprkos tomu, moguće je da postoji određena nesukladnost s općom populacijom zbog mogućih subjektivnih razlika u dijagnostičkom pristupu osoblja u različitim laboratorijima, a s obzirom na objektivno male razlike između pojedinih obrazaca IF koji mogu ovisiti i o korištenom staničnom supstratu. Također valja napomenuti da se u studiji ne radi o populacijskom uzorku, nego o prigodnom uzorku ispitanika koji su upućeni na ovu pretragu najčešće s nekim razlogom i s nekom dijagnostičkom idejom. Iz ovoga slijedi da se ne radi o populaciji zdravih ljudi, što je razvidno i iz apsolutnog udjela pozitivnih nalaz, koji su mnogo viši nego što bi se očekivalo u općoj populaciji.

Kod analize specifičnosti protutijela određenu ulogu može imati i izbor sustava testiranja prisutnosti specifičnih protutijela s predefiniranom mješavinom antigena. Specifičnost vezanja protutijela iz uzoraka može varirati između različitih proizvođača tih kompleta, ovisno o metodologiji izrade i načelu vezanja antigena i protutijela. Samom činjenicom da se radi o predefiniranoj ograničenoj specifičnosti, analize su ograničene jer velik dio rijetkih protutijela ostaje nedetektiran ovom metodom, a dobiveni su udjeli pozitivnih protutijela zapravo minimalni pozitivni udjeli koji su rezultat prisutnosti samo tih najčešćih protutijela.

Kod analize kliničkih dijagnoza postoji prostor za određenu nesukladnost s rezultatima u općoj populaciji s obzirom na to da je riječ o uputnoj dijagnozi koja ne mora nužno biti dijagnoza na koju se sumnjalo kada je odlučeno da pacijenta treba uputiti na obradu ANA. Ovo pogotovo vrijedi u slučaju upućivanja pacijenta od liječnika obiteljske medicine, koji u trenutku upućivanja često niti ne znaju definitivnu dijagnozu, nego se radi o sumnji u sklopu specijalističke obrade, što može dovesti do upućivanja na ovu i druge pretrage pod nekom zajedničkom, sveobuhvatnom, nespecifičnom dijagnozom. Ovo je možda razlog za velik udio ispitanika s dijagnozama koje se ne mogu svesti niti u jednu skupinu dijagnoza koje bi opravdavale upućivanje na dijagnostiku ANA. Kad je riječ o pacijentima upućenima direktno od specijalista reumatologa, pouzdanost dijagnoze trebala bi biti znatno veća. No, i u ovom slučaju može se pretpostaviti da u ranoj fazi dijagnostičkog procesa nije najjednostavnije diferencirati između upalnih artropatija i sistemskih autoimunosnih bolesti koje su se početno očitovale patologijom zglobova. Dijagnostičke dileme u ranim fazama bolesti, kao i

potencijalno nedovoljna snaga studije, razlog su za to da nisu provedene analize pacijenata podijeljenih na još specifičnije dijagnoze iz pojedinih spektara bolesti.

Nedoumice povezane s analizom pojedinih rijetkih obrazaca IF koje su vezane uz istodobno učestale obrasce IF pokušalo se riješiti djelomičnom zasebnom obradom unutar pojedinog obrasca IF. S obzirom na izostanak velikih razlika prema tom kriteriju vjerojatno se ne radi o velikim učincima istodobno prisutnog učestalog obrasca IF. Ipak, utjecaj takvog čimbenika ne može se u potpunosti zanemariti.

Buduće studije mogle bi pridonijeti razumijevanju rijetkih obrazaca IF, posebice onih koji su i u ovako velikom ukupnom uzorku zastupljeni u vrlo malim brojevima. Takve bi studije morale biti longitudinalne tijekom više godina, u kojima bi kvaliteta svakodnevnoga rutinskog rada morala biti na takvoj razini da omogući dosljedno bilježenje i izdvajanje popratnih karakteristika iznimno rijetkih obrazaca IF. S obzirom na manjak laboratorija koji imaju dovoljan obrtaj uzoraka upućenih na dijagnostiku ANA te na činjenicu da važeći klasifikacijski kriteriji nisu još jednoliko prihvaćeni od svih laboratorija koji se bave dijagnostikom ANA i u zemlji i u svijetu, moguće je da će rezultati ove studije pridonijeti i razumijevanju tih najrjeđih obrazaca IF za koje dodatna detaljnija karakterizacija s obzirom na sve veću zastupljenost automatiziranih sustava za detekciju ANA možda neće nikada postati dostupna.

Opseg ovog istraživanja je bez presedana u kontekstu nedavnoga klasifikacijskog konsenzusa koji se bavi karakteristikama imunofluorescencije pri dijagnostici autoimunosnih bolesti. Nova nomenklatura obrazaca IIF omogućila je egzaktnu izvedbu ovakve opsežne populacijske studije te karakterizaciju velikog broja do sada slabo analiziranih i izvještavanih obrazaca IIF. Buduće laboratorijske, ali i kliničke studije u području autoimunosnih reumatskih bolesti mogle bi profitirati iz pristupa podacima i zaključcima koji su proizašli iz ovog istraživanja.

Ovo bi istraživanje također trebalo pridonijeti učvršćivanju stava da je za adekvatno izvještavanje o prisutnosti ANA potrebno provođenje i testiranja s pomoću IIF, ili alternativno nekom budućom, još uvijek nedostupnom metodom usporedivih svojstava.

7. Zaključci

1. Zbirno su rijetki obrasci IF prisutni u 42,44 % (1743) svih ANA-pozitivnih uzoraka. U 49,92 % (870) tih slučajeva jedini su prisutni obrazac, dok su u ostalim slučajevima udruženi s nekim od učestalih obrazaca IF.

2. Ukupno gledajući, skupina ispitanika s prisutnim rijetkim obrascima IF ne razlikuje se od kontrolne skupine s prisutnim učestalim obrascima IF po pitanju spola, dobi, prisutnosti ili broju specifičnih protutijela. Nema razlike niti u prisutnosti pojedinih skupina kliničkih dijagnoza, s iznimkom jetrenih bolesti koje su u ispitanika s rijetkim obrascima IF učestalije.

3. Postoje velike razlike u učestalosti pojedinih rijetkih obrazaca IF.

4. U odnosu na kontrolnu skupinu, veći udio muškaraca zabilježen je za obrasce AC-9, AC-15, AC-16, AC-19, AC-22, AC-24 te AC-25, s tim da je samo kod obrasca AC-24 riječ o natpolovičnom broju muških ispitanika.

5. Ispitanici s obrascima AC-2, AC-7, AC-10, AC-13 i AC-24 mlađi su u odnosu na kontrolnu skupinu.

6. Pretraživana specifična protutijela su u odnosu na kontrolnu skupinu rjeđe prisutna u obrazaca AC-2, AC-9, AC-10, AC-15, AC-22 i AC-25, a učestalije u obrazaca AC-13, AC-19 i AC-29.

7. Protutijela anti-dsDNA u odnosu na kontrolnu skupinu rjeđe se pojavljuju u uzorcima s obrascem AC-10, a češće u uzorcima s obrascima AC-19 i AC-29.
Protutijela anti-TRIM21 pojavljuju se rjeđe kod ispitanika s obrascem AC-2, AC-11, AC-15, AC-23 i AC-26, a učestalije s obrascima AC-13 i AC-19.
Protutijela anti SS-A (60 kDa) rjeđa su kod obrazaca AC-9 i AC-15, a učestalija kod obrazaca AC-13 i AC-19.
Protutijela anti-SS-B učestalija su s obrascima AC-13 i AC-18.
Protutijela anti-U1-RNP češća su u obrazaca AC-7 i AC-18.
Protutijela anti-Scl70 učestalija su s obrascem AC-29.
Protutijela anti-CENP-B rjeđa su kod obrazaca AC-2, AC-9, AC-15, AC-19 i AC-29.

Antiribosomska protutijela učestalija su u kombinaciji s obrascem AC-19, kao i anti-histonska protutijela.
Protutijela anti-PCNA rjeđa su u kombinaciji s obrascem AC-2.
Ostala se analizirana protutijela javljaju sa sličnom učestalošću kao i u kontrolnoj skupini.

8. Više istodobno prisutnih specifičnih protutijela obilježje su obrazaca AC-13 i AC-19.

9. Dijagnoze sistemskih autoimunosnih bolesti rjeđe su u ispitanika s obrascima AC-22, AC-23 i AC-27, dok ta razlika kod obrasca AC-2 nije statistički važna. Ove dijagnoze učestalije su kod ispitanika s obrascima AC-13 i AC-18.

10. Dijagnoze upalnih artropatija jednako su česte u ispitanika s bilo kojim rijetkim obrascem IF u odnosu na kontrolnu skupinu.

11. Jetrene bolesti prisutne su učestalije kod ispitanika s obrascima AC-6, AC-11, AC-12, AC-15, AC-17 i AC-22.

12. Tumorske bolesti češće su kod ispitanika s obrascima AC-12 i AC-16.

13. Učestali obrasci IF prisutni su kod većine uzoraka s rijetkim obrascima AC-6 i AC-7, a iznimno rijetko u kombinaciji s obrascima AC-2 ili AC-29. U uzorcima s kombinacijama čestih i rijetkih obrazaca, obrazac AC-4 učestalije od očekivanog prisutan je kod velikog broja rijetkih obrazaca IF, i to kod obrazaca AC-9, AC-15, AC-19, AC-22, AC-23 i AC-27. Učestali obrazac AC-21 često se pojavljuje zajedno s obrascima AC-6, AC-12 i AC-26. AC-1 obrazac učestaliji je zajedno s obrascima AC-28 i AC-29, obrazac AC-3 s obrascem AC-11, AC-5 s obrascem AC-18, a AC-8 s obrascem AC-25.

14. Poželjna su daljnja istraživanja rijetkih obrazaca IF kojima bi se dodatno razjasnili najrjeđi obrasci IF. Takva istraživanja nužno su dugotrajna i nisu primjenjiva za sve uvjete dijagnostike ANA.

15. Dijagnostika ANA metodom indirektne imunofluorescencije omogućuje detekciju prisutnosti mnogo više vrsta protutijela, poznatih i nepoznatih, nego što će u budućnosti biti moguće bilo kojom metodom s predefiniranim skupom antigena. Stoga u svrhu daljnjeg napretka znanosti o protutijelima usmjerenim na unutarstanične antigene treba izbjegavati ograničavanje dijagnostike na nekolicinu najčešćih protutijela jer tako riskiramo stagnaciju

spoznaja o ovim protutijelima, uključujući i moguće koristi za dijagnostički proces mnogih bolesti, što nije ograničeno samo na sistemske autoimunosne bolesti.

8. Sažetak

U istraživanju su analizirani serumi 10955 ispitanika na protutijela ANA tijekom rutinske dijagnostičke obrade metodom imunofluorescencije (IF) na stanicama HEp-2 te su klasificirani u 30 zasebnih obrazaca prema važećim smjernicama. 22 obrasca klasificirana su kao rijetki. Od ukupnog broja seruma, ANA su potvrđena u 4107 (37,5 %) ispitanika, od kojih 2364 (57,6 %) uobičajenih i 1743 (42,4 %) rijetkih obrazaca IF. Najveći udio rijetkih obrazaca IF u svim ispitivanim uzorcima činili su obrasci AC-2, AC-15, AC19 i AC-29 (svaki > 1 %), a najmanji udio AC-17 i AC-24 s udjelom < 0,1 %. Specifična protutijela određena Theradiag FIDIS™ panelom nađena su kod 48,4 % uobičajenih obrazaca IF i 46,1 % rijetkih obrazaca IF. Općenito, ispitanici s rijetkim obrascima IF nisu se znatno razlikovali od kontrolne skupine s uobičajenim obrascima IF u odnosu na spol, dob, prisutnost ili broj specifičnih protutijela, kao ni prema skupinama kliničkih dijagnoza; iznimka su jetrene bolesti koje su bile učestalije u ispitanika s rijetkim obrascima IF. Analiza pojedinačnih rijetkih obrazaca IF u odnosu na kontrolnu skupinu pokazala je velike razlike u njihovoj učestalosti i kliničko-laboratorijskim karakteristikama. Veći udio muškaraca nađen je među obrascima AC-9, AC-15, AC-16, AC-19, AC-22, AC-24 i AC-25, dok su ispitanici s AC-2, AC-7, AC-10, AC-13 i AC-24 bili znatno mlađi. Specifična protutijela bila su manje učestala u obrascima AC-2, AC-9, AC-10, AC-15, AC-22 i AC-25, a učestalija u AC-13, AC-19 i AC-29. Dijagnoze sistemskih autoimunosnih bolesti bile su rjeđe u ispitanika s obrascima AC-22, AC-23 i AC-27, a učestalije u AC-13 i AC-18. Dijagnoze jetrenih bolesti bile su češće u obrascima AC-6, AC-11, AC-12, AC-15, AC-17 i AC-22, a tumorske u obrascima AC-12 i AC-16. Zaključno, rijetki obrasci IF ne smiju se zanemariti kod dijagnostike ANA jer mogu biti povezani s određenom kliničkom patologijom i usmjeriti daljnji dijagnostički postupak.

9. Abstract

Frequency, properties, and clinical significance of uncommon indirect immunofluorescence staining patterns of autoantibodies on HEp-2 cells

Nada Tomić Sremec, 2022

Sera of 10955 patients were routinely analyzed for presence of ANA using immunofluorescence on HEp-2 cells, and classified into 29 patterns as per international guidelines. 22 patterns were deemed uncommon. In total, ANA were found in 4107 sera, of which 2364 were common, 1743 uncommon. Specific autoantibodies determined using Theradiag FIDIS™ panel were found in 48.4% common and 46.1% uncommon patterns. Generally, common and uncommon patterns were similar regarding sex, age, presence and number of antibodies, or clinical diagnoses. Male patients were more common in AC-9, AC-15, AC-16, AC-19, AC-22, AC-24, AC-25, and AC-26 patterns, while patients with AC-2, AC-7, AC-10, AC-13, and AC-24 were substantially younger. There were fewer specific antibodies in AC-2, AC-9, AC-10, AC-15, AC-22, and AC-25 patterns, and more in AC-13, AC-19 i AC-29. Diagnoses of systemic autoimmune rheumatic diseases were less common in patients with AC-22, AC-23, and AC-27 patterns, and more common in case of AC-13 and AC-18 patterns. Liver diseases were more common in AC-6, AC-11, AC-12, AC-15, AC-17, and AC-22 patterns. Tumors were associated with AC-12 and AC-16 patterns. Uncommon ANA patterns mustn't be overlooked in ANA analysis, as they can be associated with certain pathology and influence the diagnostic procedure.

10. Literatura:

1. Holborow EJ, Weir DM, Johnson GD. A serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. Br Med J. 1957;2(5047):732-4.

2. Phan TG, Wong RC, Adelstein S. Autoantibodies to extractable nuclear antigens: making detection and interpretation more meaningful. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9(1):1-7.

3. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M i sur. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. Ann Rheum Dis. 2014;73(1):17-23.

4. Toolan HW. Transplantable human neoplasms maintained in cortisone-treated laboratory animals: H.S. No. 1; H.Ep. No. 1; H.Ep. No. 2; H.Ep. No. 3; and H.Emb.Rh. No. 1. Cancer Res. 1954;14(9):660-6.

5. Gartler SM. Apparent Hela cell contamination of human heteroploid cell lines. Nature. 1968;217(5130):750-1.

6. Chen TR. Re-evaluation of HeLa, HeLa S3, and HEp-2 karyotypes. Cytogenet Cell Genet. 1988;48(1):19-24.

7. Gorphe P. A comprehensive review of Hep-2 cell line in translational research for laryngeal cancer. Am J Cancer Res. 2019;9(4):644-649.

8. Goodman HC, Fahey JL, Malmgren RA. Serum factors in lupus erythematosus and other diseases reacting with cell nuclei and nucleoprotein extracts: electrophoretic. ultracentrifugal and chromatographic studies. J Clin Invest. 1960;39(10):1595-605.

9. Holman H, Deicher HR. The reaction of the lupus erythematosus (L.E.) cell factor with deoxyribonucleoprotein of the cell nucleus. J Clin Invest. 1959;38(11):2059-72.

10. Hargraves MM, Richmond H, Morton R. Presentation of two bone marrow elements; the tart cell and the L.E. cell. Proc Staff Meet Mayo Clin. 1948;23(2):25-8.

11. Hijmans W, Schuit HR, Mandema E, Nienhuis RL, Feltkamp TE, Holborow EJ i sur. Comparative study for the detection of antinuclear factors with the fluorescent antibody technique. Ann Rheum Dis. 1964;23(1):73-7.

12. Friou GJ. Immunofluorescence and antinuclear antibodies. Arthritis Rheum. 1964;7:161-6.

13. Miller TE, Lahita RG, Zarro VJ, MacWilliam J, Koffler D. Clinical significance of anti-double-stranded DNA antibodies detected by a solid phase enzyme immunoassay. Arthritis Rheum. 1981;24(4):602-10.

14. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. 1971;8(9):871-4.

15. Struckmann J, Manthorpe R, Bendixen G. Anti-ENA antibody in serum determined by ELISA-technique. Description of method and recommended procedure. Allergy. 1981;36(6):397-403.

16. Harley JB, Yamagata H, Reichlin M. Anti-La/SSB antibody is present in some normal sera and is coincident with anti-Ro/SSA precipitins in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 1984;11(3):309-14.

17. Rubin RL, Waga S. Antihistone antibodies in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol Suppl. 1987;14 Suppl 13:118-26.

18. Ellington AA, Kullo IJ, Bailey KR, Klee GG. Antibody-based protein multiplex platforms: technical and operational challenges. Clin Chem. 2010;56(2):186-93.

19. López-Longo FJ, Rodríguez-Mahou M, Escalona-Monge M, González CM, Monteagudo I, Carreño-Pérez L. Simultaneous identification of various antinuclear antibodies using an automated multiparameter line immunoassay system. Lupus. 2003;12(8):623-9.

20. Eissfeller P, Sticherling M, Scholz D, Hennig K, Lüttich T, Motz M i sur. Comparison of different test systems for simultaneous autoantibody detection in connective tissue diseases. Ann N Y Acad Sci. 2005;1050:327-39.

21. Tozzoli R, Antico A, Porcelli B, Bassetti D. Automation in indirect immunofluorescence testing: a new step in the evolution of the autoimmunology laboratory. Auto Immun Highlights. 2012;3(2):59-65.

22. Shovman O, Gilburd B, Zandman-Goddard G, Yehiely A, Langevitz P, Shoenfeld Y. Multiplexed AtheNA multi-lyte immunoassay for ANA screening in autoimmune diseases. Autoimmunity. 2005;38(1):105-9.

23. Martins TB, Burlingame R, von Mühlen CA, Jaskowski TD, Litwin CM, Hill HR. Evaluation of multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for detection of autoantibodies to nuclear antigens. Clin Diagn Lab Immunol. 2004;11(6):1054-9.

24. Rouquette AM, Desgruelles C, Laroche P. Evaluation of the new multiplexed immunoassay, FIDIS, for simultaneous quantitative determination of antinuclear antibodies and comparison with conventional methods. Am J Clin Pathol. 2003;120(5):676-81.

25. Tozzoli R. The diagnostic role of autoantibodies in the prediction of organ-specific autoimmune diseases. Clin Chem Lab Med. 2008;46(5):577-87.

26. Van den Bremt S, Schouwers S, Van Blerk M, Van Hoovels L. ANA IIF Automation: Moving towards Harmonization? Results of a Multicenter Study. J Immunol Res. 2017;2017:6038137.

27. Mathiaux F, Barrot A, Elong C, Parent X. Evaluation of an automated system of immunofluorescence analysis in daily practice. Ann Biol Clin (Paris). 2018;76(4):407-415.

28. Shovman O, Agmon-Levin N, Gilburd B, Martins T, Petzold A, Matthias T i sur. A fully automated IIF system for the detection of antinuclear antibodies and antineutrophil cytoplasmic antibodies. Immunol Res. 2015;61(1-2):135-40.

29. Egerer K, Roggenbuck D, Hiemann R, Weyer MG, Büttner T, Radau B i sur. Automated evaluation of autoantibodies on human epithelial-2 cells as an approach to standardize cell-based immunofluorescence tests. Arthritis Res Ther. 2010;12(2):R40.

30. Loock CD, Egerer K, Feist E, Burmester GR. Automated evaluation of ANA under real-life conditions. RMD Open. 2017;3(1):e000409.

31. Pérez D, Gilburd B, Cabrera-Marante Ó, Martínez-Flores JA, Serrano M, Naranjo L i sur. Predictive autoimmunity using autoantibodies: screening for anti-nuclear antibodies. Clin Chem Lab Med. 2018;56(10):1771-1777.

32. Pisetsky DS, Spencer DM, Lipsky PE, Rovin BH. Assay variation in the detection of antinuclear antibodies in the sera of patients with established SLE. Ann Rheum Dis. 2018;77(6):911-913.

33. Bossuyt X, Claessens J, De Langhe E, Belmondo T, Westhovens R, Hue S i sur. Antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and solid phase assays. Ann Rheum Dis. 2020;79(6):e65.

34. Hiepe F, Dörner T, Burmester G. Antinuclear antibody- and extractable nuclear antigen-related diseases. Int Arch Allergy Immunol. 2000;123(1):5-9.

35. Pisetsky DS. Antinuclear antibodies in rheumatic disease: a proposal for a function-based classification. Scand J Immunol. 2012;76(3):223-8.

36. Schur PH, Sandson J. Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. N Engl J Med. 1968;278:533.

37. Ardoin SP, Pisetsky DS. Developments in the scientific understanding of lupus. Arthritis Res Ther. 2008;10(5):218.

38. Swaak AJ, Groenwold J, Bronsveld W. Predictive value of complement profiles and anti-dsDNA in systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 1986;45:359.

39. McCarty GA, Rice JR, Bembe ML, Pisetsky DS. Independent expression of autoantibodies in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 1982;9(5):691-5.

40. Levine JS, Koh JS. The role of apoptosis in autoimmunity: immunogen, antigen, and accelerant. SeminNephrol. 1999;19(1):34-47.

41. Koh JS, Levine JS. Apoptosis and autoimmunity. Curr Opin Nephrol Hypertens. 1997;6(3):259-66.

42. Prasad KV, Prabhakar BS. Apoptosis and autoimmune disorders. Autoimmunity. 2003;36(6-7):323-30.

43. Lleo A, Selmi C, Invernizzi P, Podda M, Gershwin ME. The consequences of apoptosis in autoimmunity. J Autoimmun. 2008;31(3):257-62.

44. Kühtreiber WM, Hayashi T, Dale EA, Faustman DL. Central role of defective apoptosis in autoimmunity. J MolEndocrinol. 2003;31(3):373-99.

45. Bellone M, Iezzi G, Rovere P, Galati G, Ronchetti A, Protti MP i sur. Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. J Immunol. 1997;159:5391–5399.

46. Smeenk RJ. Antinuclear antibodies: cause of disease or caused by disease? Rheumatology (Oxford). 2000;39(6):581-4.

47. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972;26:239-57.

48. Rathmell JC, Cooke MP, Ho WY, Grein J, Townsend SE, Davis MM i sur. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. Nature. 1995;376:181-4.

49. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. Science. 1998;280:243-8.

50. Zhu J, Petit PF, Van den Eynde BJ. Apoptosis of tumor-infiltrating T lymphocytes: a new immune checkpoint mechanism. Cancer Immunol Immunother. 2019;68(5):835-847.

51. Barned S, Goodman AD, Mattson DH. Frequency of anti-nuclear antibodies in multiple sclerosis. Neurology. 1995;45(2):384-5.

52. Collard RC, Koehler RP, Mattson DH. Frequency and significance of antinuclear antibodies in multiple sclerosis. Neurology. 1997;49(3):857-61.

53. Dore-Duffy P, Donaldson JO, Rothman BL, Zurier RB. Antinuclear antibodies in multiple sclerosis. Arch Neurol. 1982;39(8):504-6.

54. Pisetsky DS. Antinuclear antibody testing - misunderstood or misbegotten? Nat Rev Rheumatol. 2017;13(8):495-502.

55. Hahn BH. Antibodies to DNA. N Engl J Med. 1998;338(19):1359-68.

56. Haugbro K, Nossent JC, Winkler T, Figenschau Y, Rekvig OP. Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity. Ann Rheum Dis. 2004;63(4):386-94.

57. Kavanaugh AF, Solomon DH; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. Arthritis Rheum. 2002;47(5):546-55.

58. Nossent JC, Huysen V, Smeenk RJ, Swaak AJ. Low avidity antibodies to double stranded DNA in systemic lupus erythematosus: a longitudinal study of their clinical significance. Ann Rheum Dis. 1989;48(8):677-82.

59. ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallenberg CG. Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study. Arthritis Rheum. 1990;33(5):634-43.

60. Cortés-Hernández J, Ordi-Ros J, Labrador M, Buján S, Balada E, Segarra A i sur. Antihistone and anti-double-stranded deoxyribonucleic acid antibodies are associated with renal disease in systemic lupus erythematosus. Am J Med. 2004;116(3):165-73.

61. Vlahakos DV, Foster MH, Adams S, Katz M, Ucci AA, Barrett KJ i sur. Anti-DNA antibodies form immune deposits at distinct glomerular and vascular sites. Kidney Int. 1992;41(6):1690-700.

62. Kurata N, Tan EM. Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. Arthritis Rheum. 1976;19(3):574-80.

63. Tsokos GC. In the beginning was Sm. J Immunol. 2006;176(3):1295-6.

64. Pannone BK, Wolin SL. Sm-like proteins wRING the neck of mRNA. Curr Biol. 2000;10(13):R478-81.

65. Benito-Garcia E, Schur PH, Lahita R; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-Sm and anti-RNP antibody tests. Arthritis Rheum. 2004;51(6):1030-44.

66. Beaufils M, Kouki F, Mignon F, Camus JP, Morel-Maroger L, Richet G. Clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus. Am J Med. 1983;74(2):201-5.

67. Barada FA Jr, Andrews BS, Davis JS 4th, Taylor RP. Antibodies to Sm in patients with systemic lupus erythematosus. Correlation of Sm antibody titers with disease activity and other laboratory parameters. Arthritis Rheum. 1981;24(10):1236-44.

68. Bonfa E, Elkon KB. Clinical and serologic associations of the antiribosomal P protein antibody. Arthritis Rheum. 1986;29(8):981-5.

69. Schneebaum AB, Singleton JD, West SG, Blodgett JK, Allen LG, Cheronis JC i sur. Association of psychiatric manifestations with antibodies to ribosomal P proteins in systemic lupus erythematosus. Am J Med. 1991;90(1):54-62.

70. Hanly JG, Urowitz MB, Su L, Bae SC, Gordon C, Clarke A i sur. Autoantibodies as biomarkers for the prediction of neuropsychiatric events in systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 2011;70(10):1726-32.

71. Koren E, Schnitz W, Reichlin M. Concomitant development of chronic active hepatitis and antibodies to ribosomal P proteins in a patient with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1993;36(9):1325-8.

72. Chindalore V, Neas B, Reichlin M. The association between anti-ribosomal P antibodies and active nephritis in systemic lupus erythematosus. Clin Immunol Immunopathol. 1998;87(3):292-6.

73. Borchers AT, Keen CL, Gershwin ME. Drug-induced lupus. Ann N Y Acad Sci. 2007;1108:166-82.

74. Totoritis MC, Tan EM, McNally EM, Rubin RL. Association of antibody to histone complex H2A-H2B with symptomatic procainamide-induced lupus. N Engl J Med. 1988;318(22):1431-6.

75. Yung RL, Johnson KJ, Richardson BC. New concepts in the pathogenesis of drug-induced lupus. Lab Invest. 1995;73(6):746-59.

76. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R i sur. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheumatol. 2019;71(9):1400-1412.

77. Chan EK, Hamel JC, Buyon JP, Tan EM. Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen. J Clin Invest. 1991;87(1):68-76.

78. Wada K, Kamitani T. Autoantigen Ro52 is an E3 ubiquitin ligase. Biochem Biophys Res Commun. 2006;339(1):415-21.

79. Deutscher SL, Harley JB, Keene JD. Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(24):9479-83.

80. Verhagen AP, Pruijn GJ. Are the Ro RNP-associated Y RNAs concealing microRNAs? Y RNA-derived miRNAs may be involved in autoimmunity. Bioessays. 2011;33(9):674-82.

81. Xue D, Shi H, Smith JD, Chen X, Noe DA, Cedervall T i sur. A lupus-like syndrome develops in mice lacking the Ro 60-kDa protein, a major lupus autoantigen. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(13):7503-8.

82. Espinosa A, Dardalhon V, Brauner S, Ambrosi A, Higgs R, Quintana FJ i sur. Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by disregulating the IL-23-Th17 pathway. J Exp Med. 2009;206(8):1661-71.

83. Fok V, Friend K, Steitz JA. Epstein-Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling. J Cell Biol. 2006;173(3):319-25.

84. Liu Y, Tan H, Tian H, Liang C, Chen S, Liu Q. Autoantigen La promotes efficient RNAi, antiviral response, and transposon silencing by facilitating multiple-turnover RISC catalysis. Mol Cell. 2011;44(3):502-8.

85. Robbins A, Hentzien M, Toquet S, Didier K, Servettaz A, Pham BN i sur. Diagnostic Utility of Separate Anti-Ro60 and Anti-Ro52/TRIM21 Antibody Detection in Autoimmune Diseases. Front Immunol. 2019;10:444.

86. Franceschini F, Cavazzana I. Anti-Ro/SSA and La/SSB antibodies. Autoimmunity. 2005;38(1):55-63.

87. Menéndez A, Gómez J, Escanlar E, Caminal-Montero L, Mozo L. Clinical associations of anti-SSA/Ro60 and anti-Ro52/TRIM21 antibodies: Diagnostic utility of their separate detection. Autoimmunity. 2013;46(1):32-9.

88. Retamozo S, Akasbi M, Brito-Zerón P, Bosch X, Bove A, Perez-de-Lis M i sur. Anti-Ro52 antibody testing influences the classification and clinical characterisation of primary Sjögren's syndrome. Clin Exp Rheumatol. 2012;30(5):686-92.

89. Izmirly PM, Llanos C, Lee LA, Askanase A, Kim MY, Buyon JP. Cutaneous manifestations of neonatal lupus and risk of subsequent congenital heart block. Arthritis Rheum. 2010;62(4):1153-7.

90. Pourmand N, Blomberg S, Rönnblom L, Karlsson-Parra A, Pettersson I, Wahren-Herlenius M. Ro 52kD autoantibodies are detected in a subset of ANA-negative sera. Scand J Rheumatol. 2000;29(2):116-23.

91. Baer AN, Medrano L, McAdams-DeMarco M, Gniadek TJ. Association of Anticentromere Antibodies With More Severe Exocrine Glandular Dysfunction in Sjögren's Syndrome: Analysis of the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Cohort. Arthritis Care Res (Hoboken). 2016;68(10):1554-9.

92. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM i sur; International Sjögren's Syndrome Criteria Working Group. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. Ann Rheum Dis. 2017;76(1):9-16.

93. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. Arch Pathol Lab Med. 2000;124(1):71-81.

94. Russo K, Hoch S, Dima C, Varga J, Teodorescu M. Circulating anticentromere CENP-A and CENP-B antibodies in patients with diffuse and limited systemic sclerosis, systemic lupus erythematosus, and rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2000;27(1):142-8.

95. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA Jr, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2003;48(5):1363-73.

96. Nikpour M, Hissaria P, Byron J, Sahhar J, Micallef M, Paspaliaris W i sur. Prevalence, correlates and clinical usefulness of antibodies to RNA polymerase III in systemic sclerosis: a

cross-sectional analysis of data from an Australian cohort. Arthritis Res Ther. 2011;13(6):R211.

97. Nguyen B, Mayes MD, Arnett FC, del Junco D, Reveille JD, Gonzalez EB i sur. HLA-DRB1*0407 and *1304 are risk factors for scleroderma renal crisis. Arthritis Rheum. 2011;63(2):530-4.

98. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. Arthritis Res Ther. 2003;5(2):80-93.

99. Kuwana M, Okano Y, Pandey JP, Silver RM, Fertig N, Medsger TA Jr. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of anti-RNA polymerase III antibody: analytical accuracy and clinical associations in systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2005;52(8):2425-32.

100. Reveille JD, Solomon DH; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee of Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. Arthritis Rheum. 2003;49(3):399-412.

101. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A i sur. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum. 2013;65(11):2737-47.

102. Sharp GC, Irvin WS, Tan EM, Gould RG, Holman HR. Mixed connective tissue disease--an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). Am J Med. 1972;52(2):148-59.

103. Greidinger EL, Hoffman RW. Autoantibodies in the pathogenesis of mixed connective tissue disease. Rheum Dis Clin North Am. 2005;31(3):437-50, vi.

104. Reiseter S, Gunnarsson R, Corander J, Haydon J, Lund MB, Aaløkken TM i sur. Disease evolution in mixed connective tissue disease: results from a long-term nationwide prospective cohort study. Arthritis Res Ther. 2017;19(1):284.

105. Netter HJ, Guldner HH, Szostecki C, Will H. Major autoantigenic sites of the (U1) small nuclear ribonucleoprotein-specific 68-kDa protein. Scand J Immunol. 1990;32(2):163-76.

106. Margaux J, Hayem G, Palazzo E, Chazerain P, De Bandt M, Haim T i sur. Clinical usefulness of antibodies to U1snRNP proteins in mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus. Rev Rhum Engl Ed. 1998;65(6):378-86.

107. Katzap E, Barilla-LaBarca ML, Marder G. Antisynthetase syndrome. Curr Rheumatol Rep. 2011;13(3):175-81.

108. Love LA, Leff RL, Fraser DD, Targoff IN, Dalakas M, Plotz PH i sur. A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. Medicine (Baltimore). 1991;70(6):360-74.

109. Stone KB, Oddis CV, Fertig N, Katsumata Y, Lucas M, Vogt M i sur. Anti-Jo-1 antibody levels correlate with disease activity in idiopathic inflammatory myopathy. Arthritis Rheum. 2007;56(9):3125-31.

110. Miller T, Al-Lozi MT, Lopate G, Pestronk A. Myopathy with antibodies to the signal recognition particle: clinical and pathological features. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2002;73(4):420-8.

111. Betteridge ZE, Gunawardena H, McHugh NJ. Novel autoantibodies and clinical phenotypes in adult and juvenile myositis. Arthritis Res Ther. 2011;13(2):209.

112. Reichlin M, Maddison PJ, Targoff I, Bunch T, Arnett F, Sharp G i sur. Antibodies to a nuclear/nucleolar antigen in patients with polymyositis overlap syndromes. J Clin Immunol. 1984;4(1):40-4.

113. Adamec I, Bošković M, Škvorc A, Posavec V, Radmilović M, Gabelić T i sur. Do we need broad immunological work-up in all patients with CIS? J Neurol Sci. 2012;315(1-2):86-8.

114. Negrotto L, Tur C, Tintoré M, Arrambide G, Sastre-Garriga J, Río J i sur. Should we systematically test patients with clinically isolated syndrome for auto-antibodies? Mult Scler. 2015;21(14):1802-10.

115. Sremec J, Tomasović S, Tomić Sremec N, Šućur A, Košćak Lukač J, Bačić Baronica K i sur. Elevated Concentrations of Soluble Fas and FasL in Multiple Sclerosis Patients with Antinuclear Antibodies. J Clin Med. 2020;9(12):3845.

116. Segni M, Pucarelli I, Truglia S, Turriziani I, Serafinelli C, Conti F. High prevalence of antinuclear antibodies in children with thyroid autoimmunity. J Immunol Res. 2014;2014:150239.

117. Siriwardhane T, Krishna K, Ranganathan V, Jayaraman V, Wang T, Bei K i sur. Exploring Systemic Autoimmunity in Thyroid Disease Subjects. J Immunol Res. 2018;2018:6895146.

118. Santos-Antunes J, Nunes AC, Lopes S, Macedo G. The Relevance of Vitamin D and Antinuclear Antibodies in Patients with Inflammatory Bowel Disease Under Anti-TNF Treatment: A Prospective Study. Inflamm Bowel Dis. 2016;22(5):1101-6.

119. Folwaczny C, Noehl N, Endres SP, Heldwein W, Loeschke K, Fricke H. Antinuclear autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease. High prevalence in first-degree relatives. Dig Dis Sci. 1997;42(8):1593-7.

120. Barahona-Garrido J, Camacho-Escobedo J, García-Martínez CI, Tocay H, Cabiedes J, Yamamoto-Furusho JK. Antinuclear antibodies: a marker associated with steroid dependence in patients with ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis. 2009;15(7):1039-43.

121. Johanet C, Beleoken E, Ballot E. Autoantibodies in autoimmune hepatitis: antinuclear antibodies (ANA). Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2012;36(4):394-6.

122. Zachou K, Rigopoulou E, Dalekos GN. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. J Autoimmune Dis. 2004;1(1):2.

123. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL i sur. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. J Hepatol. 1999;31(5):929-38.

124. Bogdanos DP, Invernizzi P, Mackay IR, Vergani D. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. World J Gastroenterol. 2008;14(21):3374-87.

125. Taniguchi Y, Yamakami A, Sakamoto T, Nakamura Y, Okada H, Tanaka H i sur. Positive antinuclear antibody in atopic dermatitis. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh). 1992;176:62-4.

126. Racoubian E, Zubaid RM, Shareef MA, Almawi WY. Prevalence of antinuclear antibodies in healthy Lebanese subjects, 2008-2015: a cross-sectional study involving 10,814 subjects. Rheumatol Int. 2016;36(9):1231-6.

127. Ghosh P, Dwivedi S, Naik S, Agarwal V, Verma A, Aggarwal A i sur. Antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence : optimum screening dilution for diagnosis of systemic lupus erythematosus. Indian J Med Res. 2007;126(1):34-8.

128. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LE. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. Arthritis Rheum. 2011;63(1):191-200.

129. Satoh M, Chan EK, Ho LA, Rose KM, Parks CG, Cohn RD i sur. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. Arthritis Rheum. 2012;64(7):2319-27.

130. Wananukul S, Voramethkul W, Kaewopas Y, Hanvivatvong O. Prevalence of positive antinuclear antibodies in healthy children. Asian Pac J Allergy Immunol. 2005;23(2-3):153-7.

131. Pisetsky DS. Antinuclear antibodies in healthy people: the tip of autoimmunity's iceberg? Arthritis Res Ther. 2011;13(2):109.

132. Conrad K, Röber N, Andrade LE, Mahler M. The Clinical Relevance of Anti-DFS70 Autoantibodies. Clin Rev Allergy Immunol. 2017;52(2):202-216.

133. Litwin CM, Binder SR. ANA testing in the presence of acute and chronic infections. J Immunoassay Immunochem. 2016;37(5):439-52.

134. Im JH, Chung MH, Park YK, Kwon HY, Baek JH, Lee SY i sur. Antinuclear antibodies in infectious diseases. Infect Dis (Lond). 2020;52(3):177-185.

135. Vlagea A, Falagan S, Gutiérrez-Gutiérrez G, Moreno-Rubio J, Merino M, Zambrana F i sur. Antinuclear antibodies and cancer: A literature review. Crit Rev Oncol Hematol. 2018;127:42-49.

136. Maire C, Vercambre-Darras S, Devos P, D'Herbomez M, Dubucquoi S, Mortier L. Metastatic melanoma: spontaneous occurrence of auto antibodies is a good prognosis factor in a prospective cohort. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2013;27(1):92-6.

137. Syrigos KN, Charalambopoulos A, Pliarchopoulou K, Varsamidakis N, Machairas A, Mandrekas D. The prognostic significance of autoantibodies against dsDNA in patients with colorectal adenocarcinoma. Anticancer Res. 2000;20(6B):4351-3.

138. Attar SM, Koshak EA. Medical conditions associated with a positive anti-double-stranded deoxyribonucleic acid. Saudi Med J. 2010;31(7):781-7.

139. Orme ME, Andalucia C, Sjölander S, Bossuyt X. A comparison of a fluorescence enzyme immunoassay versus indirect immunofluorescence for initial screening of connective tissue diseases: Systematic literature review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2018;32(4):521-534.

140. Meroni PL, Bizzaro N, Cavazzana I, Borghi MO, Tincani A. Automated tests of ANA immunofluorescence as throughput autoantibody detection technology: strengths and limitations. BMC Med. 2014;12:38.

141. Bernardini S, Infantino M, Bellincampi L, Nuccetelli M, Afeltra A, Lori R i sur. Screening of antinuclear antibodies: comparison between enzyme immunoassay based on nuclear homogenates, purified or recombinant antigens and immunofluorescence assay. Clin Chem Lab Med. 2004;42(10):1155-60.

142. Shanmugam VK, Swistowski DR, Saddic N, Wang H, Steen VD. Comparison of indirect immunofluorescence and multiplex antinuclear antibody screening in systemic sclerosis. Clin Rheumatol. 2011;30(10):1363-8.

143. Desplat-Jego S, Bardin N, Larida B, Sanmarco M. Evaluation of the BioPlex 2200 ANA screen for the detection of antinuclear antibodies and comparison with conventional methods. Ann N Y Acad Sci. 2007;1109:245-55.

144. Robier C, Amouzadeh-Ghadikolai O, Stettin M, Reicht G. Comparison of the Clinical Utility in the Detection of Anti-Nuclear Antibodies Between the Elia CTD Screen and Indirect Immunofluorescence on Hep-2 Cells: A Review of the Literature. Isr Med Assoc J. 2018;20(11):700-702.

145. Harmon CE, Deng JS, Peebles CL, Tan EM. The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. Arthritis Rheum. 1984;27(2):166-73.

146. Hendrick JP, Wolin SL, Rinke J, Lerner MR, Steitz JA. Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. Mol Cell Biol. 1981;1(12):1138-49.

147. Tanaka N, Muro Y, Sugiura K, Tomita Y. Anti-SS-A/Ro antibody determination by indirect immunofluorescence and comparison of different methods of anti-nuclear antibody screening: evaluation of the utility of HEp-2 cells transfected with the 60 kDa SS-A/Ro as a substrate. Mod Rheumatol. 2008;18(6):585-92.

148. Hornberger LK, Al Rajaa N. Spectrum of cardiac involvement in neonatal lupus. Scand J Immunol. 2010;72(3):189-97.

149. Robier C, Amouzadeh-Ghadikolai O, Stettin M, Reicht G. Comparison of the clinical utility of the Elia CTD Screen to indirect immunofluorescence on Hep-2 cells. Clin Chem Lab Med. 2016;54(8):1365-70.

150. Pham BN, Albarede S, Guyard A, Burg E, Maisonneuve P. Impact of external quality assessment on antinuclear antibody detection performance. Lupus. 2005;14(2):113-9.

151. Rigon A, Infantino M, Merone M, Iannello G, Tincani A, Cavazzana I i sur. The inter-observer reading variability in anti-nuclear antibodies indirect (ANA) immunofluorescence test: A multicenter evaluation and a review of the literature. Autoimmun Rev. 2017;16(12):1224-1229.

152. Chan EK, Fritzler MJ, Wiik A, Andrade LE, Reeves WH, Tincani A i sur. AutoAbSC.Org -- Autoantibody Standardization Committee in 2006. Autoimmun Rev. 2007;6(8):577-80.

153. Damoiseaux J, Andrade LE, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibodies 2015: From diagnostic biomarkers toward prediction, prognosis and prevention. Autoimmun Rev. 2015;14(6):555-63.

154. Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PL i sur. Report of the First International Consensus on Standardized

Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014-2015. Front Immunol. 2015;6:412.

155. Herold M, Klotz W, Andrade LEC, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Damoiseaux J i sur. International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns: defining negative results and reporting unidentified patterns. Clin Chem Lab Med. 2018;56(10):1799-1802.

156. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis. J Hepatol. 2015;63(4):971-1004. doi: 10.1016/j.jhep.2015.06.030.

157. Andrade LEC, Klotz W, Herold M, Conrad K, Rönnelid J, Fritzler MJ i sur. International consensus on antinuclear antibody patterns: definition of the AC-29 pattern associated with antibodies to DNA topoisomerase I. Clin Chem Lab Med. 2018;56(10):1783-1788.

158. Mahler M, Fritzler MJ. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on HEp-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. Clin Dev Immunol. 2012;2012:494356.

159. Ochs RL, Mahler M, Basu A, Rios-Colon L, Sanchez TW, Andrade LE i sur. The significance of autoantibodies to DFS70/LEDGFp75 in health and disease: integrating basic science with clinical understanding. Clin Exp Med. 2016;16(3):273-93.

160. Liberal R, Grant CR, Sakkas L, Bizzaro N, Bogdanos DP. Diagnostic and clinical significance of anti-centromere antibodies in primary biliary cirrhosis. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2013;37(6):572-85.

161. Bossuyt X, Frans J, Hendrickx A, Godefridis G, Westhovens R, Mariën G. Detection of anti-SSA antibodies by indirect immunofluorescence. Clin Chem. 2004;50(12):2361-9.

162. Betteridge Z, McHugh N. Myositis-specific autoantibodies: an important tool to support diagnosis of myositis. J Intern Med. 2016;280(1):8-23.

163. Satoh M, Vázquez-Del Mercado M, Chan EK. Clinical interpretation of antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. Mod Rheumatol. 2009;19(3):219-28.

164. Ceribelli A, Fredi M, Taraborelli M, Cavazzana I, Franceschini F, Quinzanini M i sur. Anti-MJ/NXP-2 autoantibody specificity in a cohort of adult Italian patients with polymyositis/dermatomyositis. Arthritis Res Ther. 2012;14(2):R97.

165. Hu SL, Zhao FR, Hu Q, Chen WX. Meta-analysis assessment of GP210 and SP100 for the diagnosis of primary biliary cirrhosis. PLoS One. 2014;9(7):e101916.

166. Satoh M, Chan JY, Ross SJ, Ceribelli A, Cavazzana I, Franceschini F i sur. Autoantibodies to survival of motor neuron complex in patients with polymyositis: immunoprecipitation of D, E, F, and G proteins without other components of small nuclear ribonucleoproteins. Arthritis Rheum. 2011;63(7):1972-8.

167. Onouchi H, Muro Y, Tomita Y. Clinical features and IgG subclass distribution of anti-p80 coilin antibodies. J Autoimmun. 1999;13(2):225-32.

168. Andrade LE, Chan EK, Raska I, Peebles CL, Roos G, Tan EM. Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. J Exp Med. 1991;173(6):1407-19.

169. Ceribelli A, Cavazzana I, Franceschini F, Airò P, Tincani A, Cattaneo R i sur. Anti-Th/To are common antinucleolar autoantibodies in Italian patients with scleroderma. J Rheumatol. 2010;37(10):2071-5.

170. Mahler M, Raijmakers R. Novel aspects of autoantibodies to the PM/Scl complex: clinical, genetic and diagnostic insights. Autoimmun Rev. 2007;6(7):432-7.

171. Okano Y, Steen VD, Medsger TA Jr. Autoantibody to U3 nucleolar ribonucleoprotein (fibrillarin) in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 1992;35(1):95-100.

172. Mehra S, Walker J, Patterson K, Fritzler MJ. Autoantibodies in systemic sclerosis. Autoimmun Rev. 2013;12(3):340-54.

173. Fujii T, Mimori T, Akizuki M. Detection of autoantibodies to nucleolar transcription factor NOR 90/hUBF in sera of patients with rheumatic diseases, by recombinant autoantigen-based assays. Arthritis Rheum. 1996;39(8):1313-8.

174. Fritzler MJ, von Muhlen CA, Toffoli SM, Staub HL, Laxer RM. Autoantibodies to the nucleolar organizer antigen NOR-90 in children with systemic rheumatic diseases. J Rheumatol. 1995;22(3):521-4.

175. Coppo P, Clauvel JP, Bengoufa D, Fuentes V, Gouilleux-Gruart V, Courvalin JC i sur. Autoimmune cytopenias associated with autoantibodies to nuclear envelope polypeptides. Am J Hematol. 2004;77(3):241-9.

176. Konstantinov K, Foisner R, Byrd D, Liu FT, Tsai WM, Wiik A i sur. Integral membrane proteins associated with the nuclear lamina are novel autoimmune antigens of the nuclear envelope. Clin Immunol Immunopathol. 1995;74(1):89-99.

177. Miyachi K, Hankins RW, Matsushima H, Kikuchi F, Inomata T, Horigome T i sur. Profile and clinical significance of anti-nuclear envelope antibodies found in patients with primary biliary cirrhosis: a multicenter study. J Autoimmun. 2003;20(3):247-54.

178. Wesierska-Gadek J, Klima A, Komina O, Ranftler C, Invernizzi P, Penner E. Characterization of autoantibodies against components of the nuclear pore complexes: high frequency of anti-p62 nucleoporin antibodies. Ann N Y Acad Sci. 2007;1109:519-30.

179. Vermeersch P, De Beeck KO, Lauwerys BR, Van den Bergh K, Develter M, Mariën G i sur. Antinuclear antibodies directed against proliferating cell nuclear antigen are not specifically associated with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 2009;68(11):1791-3.

180. Welner S, Trier NH, Frisch M, Locht H, Hansen PR, Houen G. Correlation between centromere protein-F autoantibodies and cancer analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay. Mol Cancer. 2013;12(1):95.

181. Johnson SR, Fransen J, Khanna D, Baron M, van den Hoogen F, Medsger TA Jr i sur. Validation of potential classification criteria for systemic sclerosis. Arthritis Care Res (Hoboken). 2012;64(3):358-67.

182. Liberal R, Grant CR, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Diagnostic criteria of autoimmune hepatitis. Autoimmun Rev. 2014;13(4-5):435-40.

183. Fusconi M, Cassani F, Zauli D, Lenzi M, Ballardini G, Volta U i sur. Anti-actin antibodies: a new test for an old problem. J Immunol Methods. 1990;130(1):1-8.

184. Bradwell A, Hughes R, Harden E. Atlas of Hep-2 Patterns. 2. izd. Birmingham: The Binding Site; 2003.

185. Murota M, Nishioka M, Fujita J, Dobashi N, Wu F, Ohtsuki Y i sur. Anti-cytokeratin antibodies in sera of the patients with autoimmune hepatitis. Clin Exp Immunol. 2001;125(2):291-9.

186. Fujita J, Dobashi N, Ohtsuki Y, Yamadori I, Yoshinouchi T, Kamei T i sur. Elevation of anti-cytokeratin 19 antibody in sera of the patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary fibrosis associated with collagen vascular disorders. Lung. 1999;177(5):311-9.

187. Kotaska K, Petrak B, Kukacka J, Kraus J, Prusa R. Anti-vimentin antibodies and neuron-specific enolase in children with neurofibromatosis type-1. Neuro Endocrinol Lett. 2007;28(6):761-4.

188. Seret G, Cañas F, Pougnet-Di Costanzo L, Hanrotel-Saliou C, Jousse-Joulin S, Le Meur Y i sur. Anti-alpha-actinin antibodies are part of the anti-cell membrane antibody spectrum that characterize patients with lupus nephritis. J Autoimmun. 2015;61:54-61.

189. Guéguen P, Dalekos G, Nousbaum JB, Zachou K, Putterman C, Youinou P i sur. Double reactivity against actin and alpha-actinin defines a severe form of autoimmune hepatitis type 1. J Clin Immunol. 2006;26(6):495-505.

190. Beppu M, Sawai S, Satoh M, Mori M, Kazami T, Misawa S i sur. Autoantibodies against vinculin in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. J Neuroimmunol. 2015;287:9-15.

191. Bhanji RA, Eystathioy T, Chan EK, Bloch DB, Fritzler MJ. Clinical and serological features of patients with autoantibodies to GW/P bodies. Clin Immunol. 2007;125(3):247-56.

192. Stinton LM, Eystathioy T, Selak S, Chan EK, Fritzler MJ. Autoantibodies to protein transport and messenger RNA processing pathways: endosomes, lysosomes, Golgi complex, proteasomes, assemblyosomes, exosomes, and GW bodies. Clin Immunol. 2004;110(1):30-44.

193. Satoh M, Tanaka S, Ceribelli A, Calise SJ, Chan EK. A Comprehensive Overview on Myositis-Specific Antibodies: New and Old Biomarkers in Idiopathic Inflammatory Myopathy. Clin Rev Allergy Immunol. 2017;52(1):1-19.

194. Sciascia S, Bertolaccini ML, Roccatello D, Khamashta MA, Sanna G. Autoantibodies involved in neuropsychiatric manifestations associated with systemic lupus erythematosus: a systematic review. J Neurol. 2014;261(9):1706-14.

195. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Mammen AL. Immune-Mediated Necrotizing Myopathy. Curr Rheumatol Rep. 2018;20(4):21.

196. Fritzler MJ, Choi MY, Mahler M. The Antinuclear Antibody Test in the Diagnosis of Antisynthetase Syndrome and Other Autoimmune Myopathies. J Rheumatol. 2018;45(3):444-445.

197. Shuai Z, Wang J, Badamagunta M, Choi J, Yang G, Zhang W i sur. The fingerprint of antimitochondrial antibodies and the etiology of primary biliary cholangitis. Hepatology. 2017;65(5):1670-1682.

198. Zheng B, Vincent C, Fritzler MJ, Senécal JL, Koenig M, Joyal F. Prevalence of Systemic Sclerosis in Primary Biliary Cholangitis Using the New ACR/EULAR Classification Criteria. J Rheumatol. 2017;44(1):33-39.

199. Fritzler MJ, Etherington J, Sokoluk C, Kinsella TD, Valencia DW. Antibodies from patients with autoimmune disease react with a cytoplasmic antigen in the Golgi apparatus. J Immunol. 1984;132(6):2904-8.

200. Covini G, Carcamo WC, Bredi E, von Mühlen CA, Colombo M, Chan EK. Cytoplasmic rods and rings autoantibodies developed during pegylated interferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. Antivir Ther. 2012;17(5):805-11.

201. Climent J, Morandeira F, Castellote J, Xiol J, Niubó J, Calatayud L i sur. Clinical correlates of the "rods and rings" antinuclear antibody pattern. Autoimmunity. 2016;49(2):102-8.

202. Gavanescu I, Vazquez-Abad D, McCauley J, Senecal JL, Doxsey S. Centrosome proteins: a major class of autoantigens in scleroderma. J Clin Immunol. 1999;19(3):166-71.

203. Madrid FF, Maroun MC, Olivero OA, Long M, Stark A, Grossman LI i sur. Autoantibodies in breast cancer sera are not epiphenomena and may participate in carcinogenesis. BMC Cancer. 2015;15:407.

204. Howng SL, Chou AK, Lin CC, Lin ZA, Wang CJ, Loh JK i sur. Autoimmunity against hNinein, a human centrosomal protein, in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Mol Med Rep. 2011;4(5):825-30.

205. Mozo L, Gutiérrez C, Gómez J. Antibodies to mitotic spindle apparatus: clinical significance of NuMA and HsEg5 autoantibodies. J Clin Immunol. 2008;28(4):285-90.

206. Szalat R, Ghillani-Dalbin P, Jallouli M, Amoura Z, Musset L, Cacoub P i sur. Anti-NuMA1 and anti-NuMA2 (anti-HsEg5) antibodies: Clinical and immunological features: A propos of 40 new cases and review of the literature. Autoimmun Rev. 2010;9(10):652-6.

207. Bonaci-Nikolic B, Andrejevic S, Bukilica M, Urosevic I, Nikolic M. Autoantibodies to mitotic apparatus: association with other autoantibodies and their clinical significance. J Clin Immunol. 2006;26(5):438-46.

208. Vermeersch P, Bossuyt X. Prevalence and clinical significance of rare antinuclear antibody patterns. Autoimmun Rev. 2013;12(10):998-1003.

209. Rattner JB, Mack GJ, Fritzler MJ. Autoantibodies to components of the mitotic apparatus. Mol Biol Rep. 1998;25(3):143-55.

210. Blaschek M, Muller S, Youinou P. Anti-"dividing cell antigen" autoantibody: a novel antinuclear antibody pattern related to histones in systemic lupus erythematosus. J Clin Immunol. 1993;13(5):329-38.

211. Gitlits VM, Macaulay SL, Toh BH, Sentry JW. Novel human autoantibodies to phosphoepitopes on mitotic chromosomal autoantigens (MCAs). J Investig Med. 2000;48(3):172-82.

212. Ortona E, Pierdominici M, Maselli A, Veroni C, Aloisi F, Shoenfeld Y. Sex-based differences in autoimmune diseases. Ann Ist Super Sanita. 2016;52(2):205-12.

213. Almogren A. Anti-double stranded antibody. Association with titers and fluorescence patterns of anti-nuclear antibody in systemic lupus erythematosus. Saudi Med J. 2010;31(1):32-6.

214. Shi J, Li S, Yang H, Zhang Y, Peng Q, Lu X, Wang G. Clinical Profiles and Prognosis of Patients with Distinct Antisynthetase Autoantibodies. J Rheumatol. 2017;44(7):1051-1057.

215. Alba MA, Velasco C, Simeón CP, Fonollosa V, Trapiella L, Egurbide MV i sur. Early-versus late-onset systemic sclerosis: differences in clinical presentation and outcome in 1037 patients. Medicine (Baltimore). 2014;93(2):73-81.

216. Ray D, Yung R. Immune senescence, epigenetics and autoimmunity. Clin Immunol. 2018;196:59-63.

217. Chretien-Leprince P, Ballot E, Andre C, Olsson NO, Fabien N, Escande A i sur. Diagnostic value of anti-F-actin antibodies in a French multicenter study. Ann N Y Acad Sci. 2005;1050:266-73.

218. Mahler M, Miyachi K, Peebles C, Fritzler MJ. The clinical significance of autoantibodies to the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Autoimmun Rev. 2012;11(10):771-5.

219. Takeuchi K, Kaneda K, Kawakami I, Takasaki Y, Hashimoto. Autoantibodies recognizing proteins copurified with PCNA in patients with connective tissue diseases. Mol Biol Rep. 1996;23(3-4):243-6.

220. Mahler M, Kessenbrock K, Szmyrka M, Takasaki Y, Garcia-De La Torre I, Shoenfeld Y i sur. International multicenter evaluation of autoantibodies to ribosomal P proteins. Clin Vaccine Immunol. 2006;13(1):77-83.

221. Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, Rahman A. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end? Rheumatology (Oxford). 2007;46(7):1052-6.

222. Reimer G, Rose KM, Scheer U, Tan EM. Autoantibody to RNA polymerase I in scleroderma sera. J Clin Invest. 1987;79(1):65-72.

223. Valões CC, Molinari BC, Pitta AC, Gormezano NW, Farhat SC, Kozu K i sur. Anti-ribosomal P antibody: a multicenter study in childhood-onset systemic lupus erythematosus patients. Lupus. 2017;26(5):484-489.

224. Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M. Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system. Autoimmun Rev. 2009;8(7):632-7.

225. Buyon JP. Neonatal lupus syndromes. Curr Opin Rheumatol. 1994;6(5):523-9.

226. Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. Curr Opin Genet Dev. 2002;12(2):162-9.

227. Tonutti E, Bizzaro N, Morozzi G, Radice A, Cinquanta L, Villalta D i sur. The ANA-reflex test as a model for improving clinical appropriateness in autoimmune diagnostics. Auto Immun Highlights. 2016;7(1):9.

228. Vermeersch P, Van den Bergh K, Blockmans D, Westhovens R, Bossuyt X. Anti-Golgi autoantibodies are not clinically associated with systemic autoimmune diseases. Ann Rheum Dis. 2011;70(1):234-5.

229. Guéguen P, Dalekos G, Nousbaum JB, Zachou K, Putterman C, Youinou P i sur. Double reactivity against actin and alpha-actinin defines a severe form of autoimmune hepatitis type 1. J Clin Immunol. 2006;26(6):495-505.

230. Jalbout M, Bel Hadj Jrad B, Bouaouina N, Gargouri J, Yacoub S, Zakhama A i sur. Autoantibodies to tubulin are specifically associated with the young age onset of the nasopharyngeal carcinoma. Int J Cancer. 2002;101(2):146-50.

231. Rattner JB, Rees J, Whitehead CM, Casiano CA, Tan EM, Humbel RL i sur. High frequency of neoplasia in patients with autoantibodies to centromere protein CENP-F. Clin Invest Med. 1997;20(5):308-19.

232. Bandin O, Courvalin JC, Poupon R, Dubel L, Homberg JC, Johanet C. Specificity and sensitivity of gp210 autoantibodies detected using an enzyme-linked immunosorbent assay and a synthetic polypeptide in the diagnosis of primary biliary cirrhosis. Hepatology. 1996;23(5):1020-4.

11. Životopis

Nada Tomić Sremec rođena je 1987. godine. 2002. godine upisala je srednju matematičko-prirodoslovnu XV. gimnaziju, informatičko-matematički program. Na kraju svoga srednjoškolskog obrazovanja proglašena je najboljom učenicom svoje generacije. 2006. godine, postigavši prvo mjesto na ljestvici poretka razredbenog postupka, upisala je studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 14. prosinca 2007. osvojila je Dekanovu nagradu kao najbolja studentica prve godine studija medicine. Diplomirala je u srpnju 2012. godine na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, s prosjekom ocjena 5,0. Nakon završetka studija dobila je spomen-plaketu i nagradu akademikâ Draga Perovića i Jelene Krmpotić kao najbolja studentica svoje generacije. 2012. – 2013. odradila je stručni staž u KBC-u Sestre milosrdnice u Zagrebu te je 2013. godine položila stručni ispit za doktora medicine. 2014. – 2015. bila je zaposlena kao liječnik opće medicine u ambulantama DZ Korčula i DZ Zagreb Centar. Od 2015. specijalizantica je laboratorijske imunologije u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb. 2017. godine upisala je Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu u Zagrebu.

Popis radova:

Tomić Sremec N, Kozmar A, Sremec J, Anić B, Batinić D. Properties of Uncommon Indirect Immunofluorescence Staining Patterns Determined during Antinuclear Antibody Detection on HEp-2 Cells. J Clin Med. 2021;10(17):3866.

Sremec J, Tomasović S, Tomić Sremec N, et al. Elevated Concentrations of Soluble Fas and FasL in Multiple Sclerosis Patients with Antinuclear Antibodies. J Clin Med. 2020;9(12):3845.

Buljan M, Tomić Sremec N, Sremec J, Tomas D, Crnaric I, Šitum M. Disease Progression in Cases of Multiple Primary Melanoma. Acta Dermatovenerol Croat. 2015;23(4):260-264.