

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Új eljárások az indirekt immunfluoreszcens elvű autoantitest tesztek kiértékelésében: a számítógéppel támogatott mintázatfelismerés lehetőségei és korlátai

Dr. Nagy Gábor

Témavezető: Dr. Antal-Szalmás Péter



DEBRECENI EGYETEM  
Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori  
Iskola

Debrecen, 2024

**Új eljárások az indirekt immunfluoreszcens elvű autoantitest tesztek kiértékelésében: a számítógéppel támogatott mintázatfelismerés lehetőségei és korlátai**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Nagy Gábor, okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és  
Allergológiai Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Antal-Szalmás Péter, MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Bácsi Attila, MTA doktora  
tagok: Dr. Fodor Bertalan, MTA doktora  
Dr. Gergely Lajos, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK,  
Immunológiai Intézet diszkussziós terme (ÉTK 2.209)  
2024. május 2. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Horváth Ildikó Fanny, PhD  
Dr. Nagy Eszter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Bácsi Attila, MTA doktora  
tagok: Dr. Fodor Bertalan, MTA doktora  
Dr. Gergely Lajos, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK,  
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme  
2024. május 2. 13:00 óra

## Bevezetés

Az indirekt immunfluoreszcens technika több évtizede jelen van az autoimmun diagnosztikában. Számos új antitest felfedezéséhez vezetett ez a módszer: szövetmetszeten vagy sejtrétegen sikerült kimutatni a beteg vérében keringő még ismeretlen autoantitestet. Ennek megfelelően, más módszerekkel szemben előnye, hogy képes egy lépésben számos, akár ismeretlen antitestet is detektálni. Hátránya viszont, hogy a hagyományos mikroszkópos leolvasás a sötétszobában fárasztó, időigényes folyamat, miközben nagy szakértelmet kíván. Ugyanakkor, más vizsgálati típussal nem váltható ki, elsősorban annak köszönhetően, hogy a szöveti vagy sejtes közegben az antigén konformációja megtartott, ráadásul a teszt előállítás költsége is alacsony. Az autoimmun betegségek emelkedő incidenciájának és prevalenciájának köszönhetően az autoantitest, köztük az indirekt immunfluoreszcens elvű vizsgálatok száma folyamatosan növekszik, szükségessé téve az automatizációt. Az elmúlt években olyan számítógéppel vezérelt fluoreszcens mikroszkópos rendszerek jelentek meg, melyek a látótérről digitális képet tudnak készíteni, majd azt képernyőn megjelenítik az értékelőnek, sőt képelemző algoritmus segítségével elemzik is azokat. Természetesen az ilyen számítógéppel támogatott eljárások rutin diagnosztikai alkalmazása előtt ellenőrizni kell, hogy az új értékelési módok milyen sajátosságokkal rendelkeznek és a hagyományos leolvasással összevethető eredményeket szolgáltatnak-e.

Az értekezés alapjául szolgáló tanulmányokban az anti-neutrofil citoplazmatikus és az antinukleáris antitest diagnosztika területén vizsgáltuk egy ilyen automatizált mikroszkópos és képelemző rendszer lehetőségeit és korlátait, összehasonlítva a konvencionális kiértékeléssel.

## Irodalmi áttekintés

### Autoimmunitás, autoimmun betegségek

Az autoimmun folyamatokban az immunrendszer a szervezet saját összetevőit ellen indít immunválaszt. Korábban ezt önmagában kórosnak tartottuk, ma már tudjuk, hogy korlátozott formában az egészséges szervezetben is zajlik, ami egyáltalán nem káros, sőt élettani szerepe van. Bizonyos körülmények mellett azonban patológiás autoimmunitás is kialakulhat, mely rövidebb vagy hosszabb fennállás után a szervek, szövetek, sejtek károsításával autoimmun betegségek kialakulásához vezethet. Az autoimmun betegségek a lakosság 5-7%-át, egy újabb epidemiológiai tanulmány szerint akár minden tizedik embert érintik, mind az előfordulásuk (prevalencia), mind az új esetek száma (incidencia) emelkedést mutatott az elmúlt évtizedekben.

### Az autoantitest kimutatás klinikai jelentősége

Az autoimmun betegségek többsége krónikus lefolyású, hosszú preklinikai időszakkal kezdődhet, amikor nem vagy alig észlelhetők a betegség jelei, melyet a nem differenciált fázis követhet, amely alatt még nem egyértelmű, hogy pontosan melyik betegség kialakulása várható. Emiatt hasznosak az olyan biomarkerek, amelyek a háttérben zajló autoimmun folyamatról objektív adatot szolgáltatnak.

Az autoimmunitás sok eleme vizsgálható laboratóriumi tesztekkel, de gyakorlati szempontból kiemelkedik az autoantitestek kimutatása. A kóros autoimmunitás esetén megjelenő patológiás ellenanyagok lehetnek kórjelzőek, ezek csak jelzik a betegség fennállását, de nem vesznek részt a betegség kialakításában. Másik csoportjuk patogén, azaz a betegség kialakításában, a sejt-, szövet- és szervkárosításban közvetlenül van szerepük.

### Autoantitest kimutatási módszerek

A patológiás antitestek szerencsére több jellemzőjükben elkülönülnek az élettani szerepet betöltő természetes autoantitestektől: magasabb koncentrációban fordulnak elő, erősebb affinitással rendelkeznek, jellegzetesen IgG (ritkábban IgM vagy IgA) izotípusúak, valamint az antigéncélpontjuk is gyakran más. Ezek alapján több

módszer is alkalmas arra, hogy kellően szenzitív és specifikus módon határozzunk meg kóros autoimmun ellenanyagokat. A rutin laboratóriumi gyakorlatban ezek közül az indirekt immunfluoreszcens teszt (IIFT), az enzimkapcsolt immunszorbens esszé (ELISA), valamint az immunblot vizsgálat a meghatározó, amelyek mellé az elmúlt évtizedben felzárkózott negyediknek a lumineszcens jelzésű immunesszé. Mind a négy gyakori módszerben közös elv, hogy az antitestet egy szilárd fázishoz rögzített autoantigénhez való kötődése után, a nem specifikus ellenanyagok mosással történő eltávolítását követően, egy második, jelzett antitesttel (konjugátum) mutatjuk ki. A szilárd fázison detektált jelzés erőssége általában arányos az autoantitest koncentrációjával (immunometrikus), de ritkán kompetitív elvű teszt is előfordul, ebben az esetben a jel fordítottan arányos az analit mennyiségével.

### Indirekt immunfluoreszcens teszt (IIFT)

IIFT esetén az antigént szövetmetszet vagy sejtréteg (szubsztrát) tartalmazza, amelyet mikroszkópos tárgylemez felületére rögzítenek. Előnye, hogy a kimutatáshoz nem kell ismerni az antitest pontos célpontját, így új, ismeretlen autoantitesteket is detektálni tudunk. Sok antitest felfedezését, első kimutatását köszönheti ennek a módszernek az orvostudomány. Az antitest az autoantigén elhelyezkedésének megfelelően kötődik a szubsztráton, annak megfelelő fluoreszcens mintázat ismerhető fel, amelyből következtethetünk az autoantitest célpontjára. Hátránya, hogy az azonos elhelyezkedésű antigének elleni antitesteket nem tudjuk elkülöníteni, azok azonos mintázatot adnak, illetve néhány fehérje nem fejeződik ki olyan mennyiségben a szubsztrátban, hogy az ellene termelődött ellenanyag kimutatható legyen. Ezekben az esetekben antigén monospecifikus (pl. ELISA, immunblot) tesztet kell használnunk, amelyben tisztított vagy rekombináns formában előállított antigén köti meg az autoantitestet. Az előállításnak természetesen előfeltétele az autoantigén előzetes azonosítása, karakterizálása.

## Az IIF teszt elve

Mikroszkópos tárgylemezen akár húsz, egymástól hidrofób bevonattal elválasztott területet hoznak létre, majd ide rögzítik a szövetmetszetet vagy a sejtréteget. A fixálás mellett a sejtmembránok permeabilizálása is megtörténik, ami az ellenanyagok számára hozzáférhetővé teszi akár a sejtanyagban található antigéneket is. A módszerbeállítás során meghatározott arányban hígított – általában szérum – mintában található autoantitest az első inkubációs idő alatt bekötődik, ha a szubsztrátban a megfelelő antigén jelen van. Az első mosási lépés alatt eltávolítjuk a nem specifikus antitesteket. A második inkubációs idő alatt a humán immunglobulin elleni, fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölt másodlagos antitest kapcsolódik az autoantisthez. A konjugátum határozza meg, hogy milyen izotípusú ellenanyagot mutat ki a teszt. A be nem kötődött konjugátumot a második mosással távolítjuk el. Utolsó lépésként fedőmédiumot, majd fedőlemezt helyezünk a tárgylemezre.

## Biochip alapú IIF tárgylemez

Az Euroimmun cégnél az IIF tesztek gyártása során a szubsztrátot nem hagyományos tárgylemezre, hanem vékony üveglapra rögzítik, melyet aztán 2x2 mm-es négyzetekre darabolnak fel. Ezekből a különböző szubsztráttal fedett 'biochip'-ekből maximum hatfélét közvetlenül egymás mellé tudnak helyezni egy speciális műanyag tárgylemezre, akár tíz ilyen összetett reakciómezőt alakítva ki egy lemezen.

## Az indirekt immunfluoreszcens teszt kiértékelése

Az elkészített IIFT lemezeket fluoreszcens mikroszkóp segítségével értékeljük. A sötét háttéren megjelenő, könnyen észlelhető fluoreszcens jel biztosítja az IIFT nagy analitikai érzékenységét. Az IIF lemezek tradicionális értékelési módja a szemmel történő leolvasás a mikroszkópban.

A másodlagos ellenanyaggal megjelölt autoantitest a szubsztrátban elérhető antigén elhelyezkedésének megfelelően ad jelet, jellegzetes fluoreszcens mintázatot hozva

létre. Ha a kvalitatív eredmény vagy a mintázat erősségének közlése nem elegendő, akkor az ún. végponti titer meghatározására is lehetőség van. Ennek standard kivitelezési módja az, hogy a szűrőhígítási fokból kiindulva a minta sorozathígítását készítjük el, majd meghatározzuk azt a legnagyobb hígítást, ahol az adott mintázat még pozitív.

### Számítógéppel támogatott kiértékelés

Első lépésként a tárgylemezek mozgatása szükséges, melyet számítógép-vezérelt, motorizált mikroszkóp végez el, kiemeli a tárgylemezt a lemeztároló egységből, a reakciómezőket egymás után az objektív alá helyezi, majd második lépésként digitális képet készít a látótérről. A digitális kép egyes pixeleinek fényerősségéből különböző számértékek, fluoreszcencia intenzitásértékek származtathatók. Mivel az IIFT esetén a fluoreszcenciaintenzitás arányos az autoantitest koncentrációval és a digitális képen a fényerősség pontosan meghatározható, lehetséges a szűrőhígításban látható fluoreszcencia erőssége alapján megbecsülni, hogy mennyi lenne a minta végponti titere, ha azt hagyományos titrálással, sorozathígítás készítésével határoznánk meg.

Az elkészített kép elemzésével számítógépes algoritmusok arra is képesek, hogy negatívnak vagy pozitívnak minősítsék a mintát, sőt a fejlettebb változatok akár a mintázatok felismerésére, a pozitív minták osztályozására is alkalmasak. Egy másik kiértékelési mód, ha az automatizált mikroszkóp által készített képet emberi értékelő a számítógép képernyőn elemzi és állapítja meg, hogy látható-e és ha igen milyen mintázat. Egy minta sorozathígításáról készült képek esetén pedig a monitoron olvasható le a végponti titer értéke is.

### Anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek (ANCA) kimutatása

Az ANCA kimutatás kisérgyulladással járó és más betegségekben

Az anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek felfedezését az IIF technika tette lehetővé az 1980-as években, majd később sikerült azonosítani, hogy az antigének a neutrofil sejtek granulumaiban elhelyezkedő fehérjék. Az ANCA kimutatás számos

gyulladásos és autoimmun betegségnél hasznos diagnosztikus marker, közülük is kiemelkednek a kísér-gyulladással járó kórképek.

### Az ANCA kimutatás vizsgálati módszerei

Az ANCA kimutatás eszköze kezdetben az IIFT volt etanollal fixált neutrofil granulocitákon, majd az antigének azonosítását követően a legfontosabb két antitest, a myeloperoxidáz (MPO) és a proteináz-3 (PR3) elleni ellenanyag ELISA módszerrel is mérhetővé vált. Az utóbbi években a lumineszcens immunszékek is elérhetőek lettek.

### Az indirekt immunfluoreszcens ANCA teszt

Az ANCA mintázatok típusait egy nemzetközi ajánlás és annak kiegészítése írja le. A klasszikus diffúz citoplazmatikus 'C-ANCA' mintázat erős asszociációt mutat az anti-PR3 antitestekkel, míg az anti-MPO antitestek állnak az esetek döntő többségében a klasszikus perinukleáris mintázat ('P-ANCA') háttérében. Emellett megkülönböztetünk 'atípusos C-ANCA' és 'atípusos ANCA' mintázatokot is. Több laboratórium formaldehiddel rögzített neutrofil granulocitákat is használ az etanollal fixált sejtek mellett, ami segíti az antinukleáris és ANCA megkülönböztetését és a mintázatok felismerését. Ezzel a technikával a formalin rezisztens P-ANCA és C-ANCA mellett, láthatunk formalinra érzékeny atípusos P-ANCA és atípusos C-ANCA mintázatokot is.

### Az antinukleáris antitest (ANA) kimutatás jelentősége

Az antinukleáris antitestek kimutatásának szisztémás autoimmun betegségek diagnosztizálásában elvitathatatlan jelentősége van. Kevert kötőszöveti betegségben minden beteg ANA pozitív, közel 100% a pozitivitás gyakorisága szisztémás lupus erythematosusban (SLE), a szisztémás sclerosisban szenvedők többsége, a Sjögren-szindrómás betegek 50-70%-a, a rheumatoid arthritises betegek közel fele, de az autoimmun myositisben szenvedők jelentős része is ANA pozitív. A szervspecifikus autoimmun kórképek közül az ANA klinikai jelentőségét nézve kiemelkednek az autoimmun májbetegségek, különösen nagy arányban detektálható

antinukleáris antitest autoimmun hepatitis és primer biliáris cholangitis diagnóza esetén. Néhány gyulladós kórképben (juvenilis idiopathiás arthritis (JIA), gyulladós bélbetegségek) is gyakran találkozunk ANA.

## A HEp-2 indirekt immunfluoreszcens ANA teszt

A HEp-2 sejtrétegen végzett IIFT elterjedése annak köszönhető, hogy humán eredete miatt az antigének szerkezete előnyösebb az autoantitestek kimutatására. Könnyen tenyészthető, ami olcsóbbá teszi a lemezek előállítását. A nagy mag és a sejtciklus-függő antigének expressziója miatt IIF szubsztrátként több, mint száz autoantitest kimutatását teszi. A HEp-2 IIFT teszt esetén a harmonizáció egyik fontos lépés a felismerhető mintázatok karakterizálása, elnevezése volt. Ez a folyamat már a 2000-es években elkezdődött, a ma elfogadott ICAP (International Consensus on HEp-2 ANA patterns) nevezéktant 2014-ben dolgozták ki, majd hozták nyilvánosságra a [anapatterns.org](http://anapatterns.org) oldalon. A honlap a mintázatok leírásán, képein kívül az antigén- és betegségasszociációkat is bemutatja több nyelven, köztük magyarul is.

### *Összetett, többszörös és kevert ANA mintázatok*

A mintázatfelismerést nehezíti, hogy egyszerre lehetnek jelen olyan autoantitestek, amelyek mind kimutathatók a HEp-2 IIF teszttel. Egynél több mintázat egyidejű előfordulása esetén érdemes megkülönböztetni a többszörös és a kevert mintázatokat. Többszörös mintázat esetén két vagy több, de egyértelműen megkülönböztethető mintázatot figyelhetünk meg egy szérummintában. A kevert mintázatok megkülönböztetése még nagyobb nehézséget jelent, mivel itt legalább két olyan mintázatot okozó autoantitest található a páciens mintájában, amelyeknél a fluoreszcens jel elhelyezkedésében átfedést mutat, emiatt nem lehetséges egyértelműen azonosítani az egyes komponenseket. Fontos továbbá megkülönböztetni a többszörös/kevert mintázatokat az összetett mintázatoktól (pl. Scl-70-szerű vagy PCNA-szerű), ahol többféle sejtalkotó a különböző sejtciklusokban eltérő fluoreszcens festődést mutat, de mindezt egyetlen autoantitest okozza.

## Célkitűzések

### **I. Az ANCA IIFT hagyományos, számítógépes képelemzéssel, illetve képernyőn végzett értékelésének összehasonlítása során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:**

1. Milyen a mintázat minősítésének és erősségének reprodukálhatósága? Különbözik-e az ismételhetőség a háromféle értékeléssel?
2. A mérési tartományon belül lineáris-e az egyetlen reakciómező fluoreszcenciaintenzitása alapján becsült végponti titer? Használható-e a sorozathígításon alapuló hagyományos titrálás helyett?
3. Mekkora az egyezés a minták minősítését és osztályozását illetően a képelemző algoritmus, illetve a képernyőn végzett leolvasás eredményei és a hagyományos mikroszkópos értékelés között?
4. A mintában jelen lévő zavaró antinukleáris vagy anti-citoplazmatikus antitesteknek van-e hatása az ANCA kiértékelésre?

### **II. Az ANA mintázatok közötti zavaró hatás vizsgálata, a számítógéppel támogatott kiértékelési módok összehasonlítása kapcsán a következőket kívántuk tisztázni:**

1. Milyen a HEp-2 IIF vizsgálatra küldött minták körében az egyszerre egynél több ANA mintázatra pozitív minták aránya? Mely mintázatok fordulnak elő leggyakrabban együtt?
2. Kevert mintázatok esetén fellép-e az egyes komponsek között zavaró hatás? Milyen jelentős az interferencia? Milyen titernél alakul ki? El tudja-e teljesen fedni egyik mintázat a másikat?
3. Van-e különbség a vizsgált mintázat felismerésében zavaró mintázat jelenlétében az automatizált képelemzéses, a képernyőn végzett és a konvencionális mikroszkópos értékelési módok között?

## Anyagok és módszerek

### Az egy vagy több ANA mintázattal rendelkező minták gyakoriságának meghatározása

Lekérdeztük az összes ANA HEp-2 eredményt a 2019. március 1. és december 31. közötti időszakból egy Excel-fájlba. Rögzítettük a pozitivitás/negativitást, a mintázatokat és a titer értékeiket, egy mintában legfeljebb 3 nukleáris, 1 citoplazmatikus és 1 mitotikus mintázatot tüntettünk fel. Az egyedülálló és kevert mintázatok gyakoriságát kiszámoltuk.

### Betegek és minták

#### Az ANCA IIFT összehasonlító vizsgálatához felhasznált minták

575 szérummintát elemeztünk, amit a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetébe egy három hónapos időszakban rutin ANCA vizsgálatra küldtek. Az 575 minta 570 személytől származott, 5 betegtől két minta érkezett. A laboratóriumi kivizsgálás főbb indikációja akut és krónikus veseelégtelenség, fekélyes vastagbélgyulladás (colitis ulcerosa), Crohn-betegség, szisztémás autoimmun betegségek, vasculitis és autoimmun májbetegségek gyanúja vagy nyomon követése volt.

#### A kevert antinukleáris mintázatok vizsgálatához felhasznált minták

A rutin ANA vizsgálatra küldött szérumminták közül az alapján válogattunk, hogy milyen IIFT festési mintázatot mutattak HEp-2 sejteken (Euroimmun, Lübeck, Németország). Az 1:80 kezdeti hígításban pozitívnak talált szérumokat további 1:320, 1:1280, 1:5210 hígításokban vizsgáltuk, és EuroStar II Plus fluoreszcens mikroszkóp (Euroimmun) segítségével hagyományos módon határoztuk meg a végponti titer. Olyan mintákat kerestünk, melyek vagy csak homogén nukleáris (AC-1) vagy csak finomszemcsés nukleáris (AC-4) mintázatot mutattak 1:5120 titerben.

### *A kevert ANA mintázatok előállítása*

A vagy homogén vagy szemcsés magmintázatú, 1:5120 végponti titerű szérummintákból először 40-szeres majd további három tovaafutó négyszeres (4x, 16x, 64x) hígítást készítettük hígító pufferrel. Ezen előhígítások számított végponti titerértékei 1:10240, 1:2560, 1:640, 1:160 voltak az eredeti titer (1:5120) és a hígulási faktor alapján. A homogén és a finomszemcsés mintából készült 4–4 ilyen előhígítást 1:1 arányban (25  $\mu$ L + 25  $\mu$ L) kevertük össze egymással az összes lehetséges kombinációban. Ezenkívül a 4–4 előhígítást azonos mennyiségű pufferrel is meghígítottuk, hogy csak az egyik mintázatra pozitív mintákat is vizsgálhassuk. Így összesen 16 kevert mintázattal és 4–4 izolált mintázattal rendelkező mintát vittünk fel a HEp-2 lemezekre minden futtatásnál. A felvitt mintákban így a két mintázat elvárt végponti titere 1:5120, 1:1280, 1:320, 1:80 vagy nulla volt.

### *Az indirekt immunfluoreszcens vizsgálatok kivitelezése*

Az Euroimmun Granulocyte Mosaic 13 (katalógusszám: FC 1201-1010-13) és ANA HEp-20-10 (katalógusszám: FC 1522-1010) reagenskészleteit használtuk. A kivitelezés manuálisan, szigorúan a gyártó által megadott protokoll szerint történt.

Az ANCA lemezen egy reakciómezőben három 2 x 2 mm-es „biochip” volt található. A háromféle biochipen etanollal vagy formalinnal fixált neutrofil granulociták, illetve HEp-2 sejtrétegre rászórt granulociták szolgálták szubsztrátként az autoantitestek megkötésére. A szűrő mintahígítás mértéke 1:10 volt. Az ANA lemezekben szubsztrátként megfelelően fixált HEp-2 sejtréteget alkalmaztunk. A korábban leírt módon elkészített mintákból 30  $\mu$ L-t vittünk fel egy mezőre véletlenszerű sorrendben, melyet a leolvasó nem ismert.

### *A fluoreszcens lemezek kiértékelése, a mintázatlanleolvasás módjai*

A lemezeket EUROPattern (EPa) automatizált fluoreszcens mikroszkóp és szoftvercsomag segítségével értékeltük ki, a beépített kamera 20 $\times$ -os objektívvel készített digitális képeket. A pozitív és negatív minták elkülönítését, illetve a mintázatok felismerését a beépített automatikus képanalízis is elvégezte a gyártó által kifejlesztett osztályozó algoritmusok segítségével. Ezt követően a gépi

eredményeket és a digitális képeket egy kalibrált számítógépes képernyőn a felhasználó értékelte, validálta. Végül a lemezeket hagyományos vizuális leolvasással értékeltük epifluoreszcens mikroszkóp alatt.

### Az ANCA lemezek értékelése

Az EPa automatizált képanalízis a mintákat 'nem értékelhető', 'negatív', 'C-ANCA', 'P-ANCA' vagy 'atípusos ANCA' kategóriákba sorolta. Az automatizált elemzéssel elérhető kategóriáknak való megfeleltethetőség érdekében a képernyőn történő és a hagyományos leolvasás 'atípusos C-ANCA' és 'atípusos P-ANCA' eredményeit összevontuk egy 'atípusos ANCA' kategóriába. A HEp-2 sejteken és az etanollal rögzített granulocita sejtrétegen látható fluoreszcencia mintázatok együttes értékelése alapján az általános, nem neutrofil granulocitára specifikus nukleáris vagy citoplazmatikus sejtkomponensekhez kötődő antitestekkel rendelkező mintákat pedig külön 'ANA/ACyA interferencia' csoportba soroltuk, mivel ezek az antitestek bizonytalanára vagy lehetetlenné teszik az ANCA mintázat értékelését.

### Az ANA lemezek értékelése

A EUROPattern automatizált mintázatfelismerő rendszer az osztályozás során az alábbi kategóriákba sorolja be a mintákat: pozitív, negatív, határértékű és nem értékelhető (?). Továbbá azonosítani tud nyolcféle ANA mintázatot/mintázats csoportot: nukleáris homogén, nukleáris szemcsés, centromer, nukleáris pontok, nukleoláris, magmembrán, osztódási orsó és citoplazmatikus. A képernyőn történő és a hagyományos leolvasás során az értékelők az ANA mintázatokot azonosították, majd a mintázat fluoreszcencia intenzitását (FI) becsülték a negatív (0)/1+/2+/3+/4+ szemikvantitatív skálán.

### Az ANCA teszt reprodukálhatósági vizsgálata

Három alacsony vagy közepesen pozitív C-ANCA, P-ANCA és atípusos ANCA mintázatú mintát ötször-ötször teszteltük három külön napon. Összevetettük a felismert mintázatot és a fluoreszcencia intenzitás/becsült végponti titer értékeit mindhárom kiértékelési módszer esetén.

## A becsült végponti titer linearitásának vizsgálata

A teszt linearitása egy adott tartományon belül azt jelenti, hogy a méréssel kapott eredmények egyenesen arányosak az analit szintjével. Két C-ANCA-mintával, két P-ANCA-mintával és egy atípusos ANCA mintával dolgoztunk, kétszeres hígítási sort készítettünk, majd meghatároztuk a végponti titert konvencionális mikroszkópos értékeléssel. Ezután minden hígítást kiértékelünk az EPa segítségével, az így kapott becsült titert az elvárt titer értékkel hasonlítottuk össze, amit a végponti titerből és a hígítási tényezőtől számítottunk.

## A számított és a hagyományos titer korrelációjának vizsgálata

Az ANCA végponti titer értékeket 32 mintában hagyományos módszerrel határoztuk meg. Az 1:10-es szűrőhígításból készült kép alapján az EPa becsült végponti titer eredményeket hasonlítottuk a hagyományos végponti titerekkel és Spearman-féle rangkorrelációt végeztünk.

## Az ANCA lemezek kiértékelési idejének számítása

Mindhárom kiértékelési módszer esetén megmértük az egy futtatás összes lemezének leolvasásához szükséges időt, majd elosztottuk a minták számával. Négy futtatásból átlagot és szórást számítottunk.

## A statisztikai elemzés módszerei

Az összes eredmény, valamint külön a pozitív/negatív minták egyezőségét, és a Cohen-kappa együtthatókat kiszámoltuk. A különböző leolvasási módokkal kapott mintázaterősség/titer értékek összefüggését Spearman-féle rangkorrelációs analízissel vizsgáltuk. A statisztikai elemzésekhez, illetve az ábrák készítéséhez a GraphPad Prism és Microsoft Excel szoftvert használtuk. A statisztikai teszteknel a  $p < 0,05$  értéket tekintettük szignifikánsnak.

## Eredmények

### Az ANCA vizsgálatok eredményei

#### A mintázat felismerésének és erősségének reprodukálhatósága

Hagyományos és képernyőn történő leolvasással mindhárom mintában minden ismétléssel az elvárt mintázatot kaptuk. Az automatizált képanalízissel mind a 15 mérés ugyanazt a mintázatot adta a P-ANCA pozitív mintával, a C-ANCA pozitív mintával a várt eredményt kaptuk 14 alkalommal, az atípusos mintával pedig 13 alkalommal. A becsült végponti titerek jó reprodukálhatóságot mutattak, az összes eredmény a medián  $\pm$  egy hígítási lépés tartományban volt mindhárom mintázat esetében. A fluoreszcenciaintenzitás reprodukálhatósága is elfogadható volt.

#### A becsült titer linearitásának vizsgálata

Az erős pozitív minták sorozathígításával közel lineáris választ kaptunk az 1:10-1:80 tartományban, de a görbék ellaposodtak, amikor a titerbecslés elérte az 1:320 értéket. Érdekes, hogy mindkét C-ANCA pozitív mintánál jelentős alámérést lehetett látni magas antitest-koncentrációnál (high dose hook effect).

#### Az EPa becsült titer és a hagyományos végponti titer korrelációja

Az összes mintát együtt vizsgálva a Spearman-féle  $r$  együttható 0,70 volt ( $p < 0,001$ ). Erősebb korrelációt lehetett megfigyelni a P-ANCA ( $r = 0,74$ ,  $p = < 0,001$ ) pozitív minták esetén.

#### A negatív és nemnegatív minták elkülönítése

A konvencionális leolvasás alapján negatívnak minősített 401 mintából 328-at (81,8%) negatívnak minősített az automatizált képértékelés is. Az álpozitív minták száma 73 volt, ebből 6, 19, illetve 48 mintát osztályozott az algoritmus P-ANCA, C-ANCA, illetve atípusos ANCA-nak. Az összes ilyen minta gyenge/határérték pozitivitást mutatott az EPa rendszerrel. A negatív eredmények egyezése 95,3%-ra emelkedett (382/401), amikor a képeket a képernyőn értékeltük.

167 minta került a nemnegatív csoportba a konvencionális mikroszkóppal történő leolvasással: 23 (4,0%) P-ANCA, 17 (3,0%) C-ANCA, 47 (8,3%) atípusos ANCA

és 80 (14,1%) értékelhetetlen volt interferáló antitest miatt (ANA/ACyA interferencia). A nem értékelhető eredmények többségét ANA jelenléte okozta (80-ból 74, 93%). A nemnegatív minták körében a konvencionális leolvasással való egyezés kiváló volt az automatizált (161/167 = 96,4%) és tökéletes (100,0%) a képernyőn történő kiértékelési mód esetén. Csak 5 atípusos ANCA és 1 ANA pozitív minta esetében volt negatív az EPa, ezeket is helyesen minősítették az értékelők a képernyő előtt. Összességében az automatizált képértékelés eredményeinek 86,1%-a (489/568) volt összhangban a szokásos, konvencionális értékeléssel, míg a konkordancia 96,7% -ra nőtt (549/568) a képek képernyőn történő áttekintése után.

### A minták osztályozása mintázatfelismerés alapján

A EUROPattern automatizált értékelése a minták 69,0%-át helyesen sorolta be, ha az ANCA mintázatot is figyelembe vesszük. A jól osztályozott minták aránya 95,1%-ra emelkedett, amikor a leolvasó a képernyő előtt dolgozott. Ha a gépi algoritmus eredményességét nézzük, akkor a helyesen azonosított minták aránya a legmagasabb a P-ANCA pozitív (87,0%), legalacsonyabb az atípusos ANCA pozitív (63,8%) szérumok között volt. Hangsúlyozni kell azonban, hogy egyetlen pozitív P-ANCA vagy C-ANCA mintát sem kategorizált az EPa negatívnak. A helyesen osztályozott minták aránya 91,3% és 95,7% között változott, ha a mintázatot humán értékelő azonosította a számítógép képernyőjén.

### Az antinukleáris és anti-citoplazmatikus antitestek hatása a mintázatfelismerésre

Az egyezés az automatizált és hagyományos értékelés között szignifikánsan gyengébb volt, ha ANA mintázat volt látható a HEp-2 sejteken (Cohen-féle kappa: 0,534 az 0,335-höz képest), de az ACyA jelenlétének ugyanilyen hatása nem volt kimutatható. Nem volt különbség a képernyőn végzett és a hagyományos leolvasás eredményei közötti egyezésben, az ANA/ACyA jelenléte nem rontotta le azt.

A gépi és képernyő előtti kiértékelés hatása a leolvasási időre

Az autofókuszálás, a képfelvétel és az automatikus értékelés egy reakciómezőn  $63,8 \pm 1,5$  másodpercig tartott. A hagyományos leolvasással  $79,5 \pm 9,0$  másodpercet vett igénybe egy mező leolvasása, míg egy minta kiértékeléséhez a képernyőn jóval kevesebb időre volt szükség ( $46,8 \pm 2,4$  másodperc,  $p < 0,001$ ).

A kevert ANA mintázatok vizsgálatának eredményei

Az egy vagy több ANA mintázattal rendelkező minták gyakorisága

Összesen 10 587 mintán végeztünk ANA HEp-2 IIF tesztet laboratóriumunkban 2019. március 1. és 2019. december 31. között. A 4 291 nukleáris pozitív mintából 2 786 (64,9%) csak egy, 1 396 (32,5%) kettő, míg 109 (2,5%) három különböző magmintázatra volt pozitív. A citoplazmatikus és mitótikus pozitivitásnál 15 (1,4%) és 4 (2,5%) mintánál két különböző citoplazmatikus, illetve mitótikus mintázat volt jelen. A homogén és finomszemcsés magmintázat kombinációja messze a leggyakoribb volt.

Az elvárt mintázattal való egyezés a zavaró mintázat jelenlétében

*A szemcsés magmintázat hatása a homogén magmintázat felismerésére*

Azokat a mintákat, amelyek csak homogén mintázatot mutattak, a hagyományos és a képernyőn végzett értékeléssel is 100%-ban sikerült megfelelően osztályozni, míg az EPa besorolása szignifikánsan pontatlanabb volt ( $60,7\%$ ,  $p = 0,0002$ ). Ha a homogén mintázat titere magasabb, mint a szemcsés mintázaté, akkor a zavaró szemcsés mintázat jelenlétében az egyezés 100% hagyományos és 97% képernyőn végzett értékelés esetén, ugyanakkor az EPa kép elemzésének egyezési aránya (83%) kissé, de szignifikánsan alacsonyabb volt ( $p = 0,0002$ , illetve  $p = 0,0028$ ). Az egyezés százaléka csökkent, ha a zavaró mintázat titere azonos (hagyományos: 90,2%, képernyős: 86,9%, EPa: 78,7%) vagy magasabb volt (hagyományos: 55,2%, képernyős: 50,0%, EPa: 54,2%), mint a homogén mintázat titere.

### *A homogén magmintázat hatása a szemcsés magmintázat felismerésére*

A csak szemcsés mintázatú minták azonosítási aránya 100% volt hagyományos és képernyőn végzett értékelésnél, míg az EPa esetében csak 63,6% ( $p < 0,0001$ ). A szemcsés mintázat felismerési aránya a homogén mintázat jelenlétében hagyományos és képernyőn végzett leolvasással 87%, illetve 90% volt, abban az esetben, ha a finomszemcsés mintázat szintje magasabb volt, mint a zavaró homogén mintázaté. Az EPa automatikus elemzés felismerési aránya jó volt (69,8%), de szignifikánsan gyengébb a másik két módszerhez képest ( $p = 0,0052$  és  $p = 0,0007$ ). Amikor a két mintázat titere azonos volt, az egyezési arány 14,8% volt az EPa használatával, míg a szemcsés magmintázatot hagyományos és képernyőn végzett értékeléssel jelentősen magasabb hányadban azonosítottuk helyesen (45,9%,  $p = 0,0002$ , illetve 54,1%,  $p < 0,0001$ ). Az egyezési arány 20% alatt volt, amikor a zavaró mintázat szintje magasabb volt, mint a szemcsés mintázaté (hagyományos: 2,7%, képernyős: 10,7%, EPa: 1,3%).

A megfigyelt és a várt fluoreszcencia intenzitás/titer korrelációja

*Vizsgált mintázat: homogén magmintázat, zavaró mintázat: finomszemcsés magmintázat*

A homogén mintázat fluoreszcencia intenzitása a hagyományos és a képernyőn végzett értékelési módszerekkel erős korrelációt mutatott a várt titerrel mind a finomszemcsés mintázat jelenléte, mind a hiánya esetén (Spearman-féle r rangkorrelációs együttható: 0,79–0,99). Ezzel szemben az EPa automatikus képértékelés becslt titerértékei sokkal kevésbé voltak pontosak. Szemcsés mintázat jelenlétében a homogén mintázat várt és észlelt titer értékei között mérsékelt, de szignifikáns korrelációt meg lehetett figyelni ( $r$ : 0,44–0,72, minden  $p$ -érték  $< 0,01$ ) az EPa automatikus képértékelés esetében is. A zavaró szemcsés mintázat titerének változása nem befolyásolta szignifikánsan a vizsgált homogén mintázat elvárt és észlelt titerének/fluoreszcencia intenzitásának korrelációját.

*Vizsgált mintázat: finomszemcsés magmintázat, zavaró mintázat: homogén magmintázat*

A rangkorreláció erős volt ( $r: 0,80-1,00$ ) a szemcsés mintázat észlelt és várt fluoreszcencia intenzitása között a hagyományos és képernyőn végzett értékeléseknél, de csak akkor, ha a zavaró homogén mintázat hiányzott vagy annak titere 1:1280 alatt volt. Az automatikus képértékelés ebben a tartományban erőstől gyenge szintig terjedő korrelációt mutatott ( $r: 0,83-0,33$ ). Alacsony szintű korrelációt találtunk ( $r < 0,5$ ) minden értékelési típusban, ha a homogén mintázat jelen volt 1:1280 vagy 1:5120 titerben. Összességében a korreláció jelentősen csökkent a zavaró mintázat titerének növekedésével.

*A szemcsés magmintázat homogén magmintázatra kifejtett zavaró hatásának részletes elemzése*

A várt 1:80 (1+) pozitív homogén minták esetén a homogén mintázat megfigyelt fluoreszcencia intenzitása a hagyományos és képernyőn végzett értékelés során szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) alacsonyabb volt, mint a FI a szemcsés mintázat nélküli mintákban, ha a zavaró szemcsés mintázat titere 1:1280 vagy annál magasabb volt. Ugyanezt nem lehetett megítélni az EPA esetén, mert a zavaró mintázat hiányában az összes homogén mintát 'nem értékelhető' kategóriába sorolta és nem adott meg becsült titeret. Azonban - hasonlóan a más két értékelési típushoz -, ha a homogén mintázat elvárt titere 1:80 volt és a szemcsés mintázat titere  $\geq 1:1280$  volt, a homogén mintázatot legtöbbször nem ismerte fel a képelemző algoritmus. A homogén mintázat erősségének ugyanilyen alulbecslése látható, ha a homogén mintázat 1:320 vagy 2+ erősségű, de a különbségek itt nem szignifikánsak. Szignifikáns negatív interferencia nem látható, ha a homogén mintázat várt titere 1:1280 vagy 1:5120, függetlenül attól, hogy a szemcsés mintázat titere mennyire magas. Ugyanakkor szignifikáns ( $p = 0,0147$ ) felülmérés tapasztalható a homogén mintázat képernyőn megfigyelt fluoreszcencia intenzitásában, ha a várt homogén mintázat titer 1:1280 és zavaró szemcsés mintázat van jelen 1:320 titerben. A homogén mintázat erősségének megítélésében az EPA becsült titer a legkevésbé

pontos, amit a még zavaró antitest hiányában is megmutatkozó számottevő túlbecslés jól mutat. Ezenkívül világosan látható, bár statisztikai tesztekkel nem elemeztük, hogy egy második szemcsés mintázat jelenlétében a homogén mintázat erőssége nagyobb variabilitással határozható meg.

## A homogén magmintázat szemcsés magmintázatra kifejtett zavaró hatásának részletes elemzése

Az 1:80 titerű szemcsés mintázatú minták megfigyelt fluoreszcencia intenzitása hagyományos és képernyőn végzett értékeléssel szignifikánsan alacsonyabb volt ( $p$  értékek:  $<0,0001$ -től  $0,0378$ -ig), ha a zavaró homogén mintázat titere  $\geq 1:320$ . Ez a negatív irányban ható interferencia statisztikai teszttel nem volt igazolható az EPA értékelésénél, mivel a referenciaként használt határérték pozitív mintáknál sok álnegatív eredményt kaptunk. Az összes olyan keveréknél, ahol a szemcsés mintázat várt titere  $\geq 1:320$  és a zavaró homogén mintázat titere  $\geq 1:1280$ , a szemcsés mintázat erősségének szignifikáns alulbecslését láttuk ( $p$  értékek:  $<0,0001$ -től  $0,0158$ -ig), kivéve kettő kombinációt. Valójában ebben a két esetben is valószínűsíthető negatív interferencia, csak az alulbecslés nem szignifikáns 1:1280, csak 1:5120 titerű zavaró homogén mintázat mellett ( $p = 0,0051$ , illetve  $p = 0,0036$ ). Kis mértékű, de nem szignifikáns ( $p = ns$ ) a szemcsés mintázat FI-nak túlbecslése a képernyőn végzett értékelés során azokon a mintákon, ahol a zavaró homogén mintázat titere 1:80. Az EPA becsült titer pontatlansága feltűnő a zavaró homogén mintázat nélküli határérték pozitív szemcsés mintázatú minták esetében. Hasonlóan a szemcsés mintázat zavaró hatásához, a szemcsés mintázat fluoreszcencia intenzitásának megítélése is bizonytalanabb, nagyobb szórással olvasható le egy második homogén mintázat jelenlétében.

## Megbeszélés

### Az ANCA vizsgálatok eredményei

Az ANCA vizsgálatok területén célunk az volt, hogy megvizsgáljuk az Euroimmun EUROPattern (EPa) automatizált IIF mikroszkópos rendszert és összehasonlítsuk a számítógéppel segített értékelési módokat a hagyományos leolvasással nagyszámú, olyan rutin mintán, melyek az immunológia, reumatológia, nefrológia, gasztroenterológia és hepatológia szakterületek szakorvosaitól érkeztek, így az ANCA meghatározás minden indikációját lefedik.

Először az IIF rendszer analitikai megbízhatóságát teszteltük. Az ismételhetőségi vizsgálatunk jó reprodukálhatóságot mutatott az EPa automatikus értékelés esetében. A P-ANCA, a C-ANCA és az atípusos ANCA mintázatot mutató alacsony vagy határértékű pozitív mintákat minden futtatásban az elvártan megfelelően osztályozta az algoritmus, csak egy teszt adott negatív eredményt.

A kép fluoreszcenciaintenzitásából számolt titer linearitása elfogadható volt az 1:10–1:100 tartományban, de efelett a görbe ellaposodott. Ez valószínűleg a fluoreszcenciaintenzitás és a 8 bites kamera által digitalizálható fényintenzitás tartományai közötti nagy különbségre vezethető vissza.

Fontos viszont, hogy néhány erősen pozitív mintánál magas dózisu hook-effektus jelentkezett. Ez a jelenség IIF esetén is ismert: fluoreszcencia quenching vagy a konjugátum bekötődésének sztérikus gátlása csökkentheti a fluoreszcencia erősségét, ha az autoantitest koncentrációja rendkívül magas.

Tanulmányunkban a szérumok 70,6%-a volt negatív, és ezek 81,8%-át sorolta be az automatizált képelemzés helyesen. Ennél fontosabb, hogy a 334 automatizált képanalízissel negatív mintából 328-at a hagyományos értékelés is negatívnak minősített. Csak 6 minta volt álnegatív, de az értékelő mindegyiket helyesen minősítette a képernyőn.

A képelemző algoritmus négy különböző kategóriába csoportosít: negatív, C-ANCA, P-ANCA vagy atípusos ANCA. A nálunk beüzemelt készülék szoftvere nem volt alkalmas arra, hogy megkülönböztesse az antinukleáris vagy anti-

citoplazmatikus zavaró mintázatokat az ANCA-tól, ami az ötödik kategóriát ('ANA/ACyA interferencia') képezte a hagyományos és a képernyőn történő értékelés során.

Vizsgálatunkban a minták 69,0%-a kategorizálta a EUROPattern képanalízis a hagyományos mikroszkópos olvasás eredményének megfelelően, míg a képernyőn végzett értékelésnél ez az arány 95,1% volt. A 401 negatív mintából csak 19-et minősített helytelenül pozitívnak, míg a 167 nemnegatív mintából 9-et negatívnak az értékelő a képernyőn. Ezek az eredmények is azt mutatják, hogy a számítógépes értékelés önmagában nem elég pontos.

Az EPa helytelen osztályozása döntően két okra volt visszavezethető:

i) Negatív mintákat sorolt a pozitívak közé. Ezeket az eltéréseket külön megvizsgálva azt láttuk, hogy többségük olyan minta volt, amiknél a fluoreszcencia intenzitása a határértékhez nagyon közeli volt, mely a hagyományos értékeléssel még negatív besorolást kapott, de az EPa már pozitívnak minősítette.

ii) A hibás EPa kategorizálás másik gyakori oka az ANA és/vagy ACyA interferencia volt. Ezeket a mintákat az EPa legtöbbször atípusos ANCA-ként osztályozta, mivel mind az antinukleáris, mind az anti-citoplazmatikus antitest pozitivitást okoz az etanollal rögzített granulocitákon, míg a formalinnal rögzített neutrofil sejtek negatívak, hasonlóan az atípusos mintázathoz. Ezen esetek többsége a képernyőn jó besorolást kapott.

A EUROPattern mikroszkóp/szoftver értékeléséről ANCA vonatkozásában csak egy korábbi vizsgálatot találtunk, de az is más beteganyagon és más reagensek felhasználásával történt. Ebben a tanulmányban Csernok és mtsai. különböző típusú vasculitises betegeket, egészséges egyéneket és autoimmun és gyulladáso s rendellenességekben szenvedőket vizsgáltak, de kizárták a gyulladáso s bél- és autoimmun májbetegségeket. Az automatizált IIFT érzékenysége és specifitása vasculitis esetében 89,8% és 89,2% volt, a ROC AUC értéke pedig 0,904.

Az automatizált IIF mikroszkópok alkalmazása várhatóan azt eredményezi, hogy rövidül az analízis összideje. A mi tanulmányunkban 41%-kal csökkentette az értékelési időt.

## A kevert ANA mintázatok vizsgálatának eredményei

A digitális képet elemző számítógépes algoritmusok megbízható adatokat szolgáltathatnak az ANA pozitivitás/negativitás tekintetében, de az ANA mintázatok azonosítása még mindig kihívást jelent. Ha összehasonlítjuk a mintázatok algoritmusok által önállóan végzett osztályozását a hagyományos mikroszkópos értékeléssel, akkor az egyezés az Aklides rendszer esetében 43,0% és 84,7%, a EPa esetében 69,0% és 87,1%, a NovaView esetében 53,8% és 70,8%, Zenit G-sight esetében 26,0% és 63,0% között változik, míg a Helios esetében 70,8%.

Az egyedi mintázatok esetén a helyes azonosítás százalékos arányai még szélesebb tartományban változnak. A homogén mintázatot 46,7% és 95,0% között, a szemcsés mintázatot 11,1% és 76,9% között, a nukleoláris mintázatot 33,3% és 100% között, míg a centromer mintázatot 25,0% és 92,7% között azonosították jól a különböző automatizált rendszerek. A nagy variabilitásért részben az eszközök képességei, részben a tanulmányok felépítése közötti különbségek okolhatók.

A számítógéppel támogatott rendszereknél nagyobb a helyesen felismert mintázatok aránya, ha a rögzített digitális képet nem a képelemző algoritmus, hanem az ANA mintázatok leolvasásában jártas szakember értékelté képernyőn. Az egyezés aránya a monitoron és a konvencionális mikroszkópos értékelés között hasonlóan magas volt az EPa (94,6%), a NovaView (97,0%) és a Zenit G-sight (90,0%) esetében.

A legnehezebb feladat az ANA IIF értékelése során az olyan minták osztályozása, melyek egyszerre egynél több mintázattal rendelkeznek. Tudomásunk szerint jelenleg az automatizált, számítógéppel segített rendszerek közül csak a EUROPattern képelemző algoritmus képes kategorizálni az ilyen többszörös vagy kevert mintázatokot és azonosítani az egyes komponenseit. Azon esetek aránya, ahol a EUROPattern képelemző szoftvere a domináns mintázatot a klasszikus mikroszkópos értékelésnek megfelelően azonosította viszonylag magas volt: 87,5%

és 95,2%. Ezzel szemben a többszörös/kevert mintázat minden komponensét csak 33,3% és 68,4% közötti arányban azonosította helyesen az automatizált rendszer. Ezen adatok alapján az ANA mintázatok pontos osztályozása az automatizált, számítógép-segített rendszerek számára még mindig nagy kihívás, ami még kifejezettebb több egyidejű ANA mintázat esetén.

A rutin diagnosztikában ez nagyon lényeges, hiszen a több ANA mintázattal rendelkező minták aránya viszonylag magas. Az általunk vizsgálat 10 hónapos időszakban a pozitív minták több, mint harmadában (36,3%) volt többszörös/kevert mintázat, és hasonló arányokat mutattak korábbi tanulmányok is.

A számítógépes ANA mintázatfelismerő rendszerek megítélésének fő problémája az, hogy nincsenek megfelelő többszörös/kevert mintázatot mutató referenciamintáink, azaz olyan minták, melyek minden mintázata és azok titeré is pontosan ismert. A rutin diagnosztikából származó szérumminták nem felelnek meg ennek a célnak, mivel kevert mintázat esetén a hagyományos mikroszkópos ANA leolvasásban jártas szakértők sem tudnak pontos eredményt szolgáltatni. A probléma megoldása érdekében egy új megközelítést alkalmaztunk. Két különböző mintázatra izoláltan, magas titerben pozitív minta sorozathígításait készítettük el és kevertük össze, így jól definiált, ismert mintázatú és titerű kevert mintákat hoztunk létre. Ezeken a keverékeken HEp-2 IIF vizsgálatot végeztünk, és a két különböző mintázat jelenlétét és erősségét értékeltük az összes keverékben. A két ANA mintázat egymásra kifejtett hatását a leggyakoribb mintázatkombináció, a homogén magmintázat (AC-1) és a finomszemcsés magmintázat (AC-4) vizsgálatával kezdtük.

Eredményeink azt mutatják, hogy a homogén magmintázat nagyobb mértékben akadályozza a finomszemcsés magmintázat megítélését, mint fordítva, de mindkét mintázat zavarja a másik felismerését. A kevert mintázatú minták jelentős részében a homogén mintázat akár teljesen el is fedheti, maszkolhatja a szemcsését ugyanabban a mintában, és - bár sokkal ritkábban - az alacsony titerű homogén mintázat is teljesen rejtett maradhat egy magas titerű szemcsés mintázat mellett.

Bizonyos esetekben az elfedett komponens látható válhat titrálással, azaz a minta hígításával.

Az ANA mintázatok közötti interferencia ismerete fontos ahhoz, hogy jól működő laboratóriumi kivizsgálási algoritmusokat alakíthassunk ki. Nemrégiben tettek közzé egy ANA vizsgálati protokollt, amely a másodvonalbeli autoantitest tesztek sorrendjére tesz javaslatot a HEp-2 sejteken észlelt mintázat alapján. A mintázat típusa és titere alapján az adott leletre specifikus megjegyzésekkel részletes információt lehet átadni arról, hogyan zavarhatja egy mintázat a másik azonosítását. Az elfedés mellett érdekes módon bizonyos esetekben az interferáló antitest jelenléte fokozta a vizsgált mintázat intenzitását. Az erősítés statisztikailag is szignifikáns volt 1:1280 titerű homogén mintázat képernyőn végzett leolvasásánál, ha a zavaró szemcsés mintázat 1:320 titerű volt. A homogén mintázat erősségének felülbecslése annak a következménye lehetett, hogy a szemcsés mintázat fluoreszcens fénye részben összeadódott a homogén mintázat jelével leolvasás közben.

A különböző kevert homogén-szemcsés mintázatú minták értékelése során a hagyományos mikroszkópos és a képernyőn történő leolvasás nagyon hasonló eredményeket mutatott. Ugyanakkor a számítógépes képelemzésen alapuló minősítés önmagában gyengébb teljesítményt mutatott, és a titerbecslés pedig még kevésbé volt pontos. Ezek az eredmények az mutatják, hogy a jelenlegi számítógépes mintafelismerő algoritmusok még kevert mintázatú mintáknál is viszonylag jól, de a hagyományos és képernyőn végzett humán értékelésnél rosszabbul azonosítják a mintázatot, de a fluoreszcencia intenzitáson alapuló titerbecslés még nem igazán megbízható. Ez utóbbi felhívja a figyelmet arra, hogy a fluoreszcens mintázat erősségének meghatározása nem egyenlő egyszerű fényerősség méréssel, hiszen abban egy digitális kamera nyilvánvalóan jobb volna, mint az emberi szem.

Az ANA HEp-2 mintázatok között interferencia tanulmányozására kidolgozott megközelítésünk újnak mondható. A szakirodalomban csak két tanulmányt találtunk, amely ANA mintázatok közötti interferenciával foglalkozik, de ezekben a tanulmányokban különböző mintázatokra erősen pozitív mintákat használtak (a titer

meghatározása nélkül), majd azokat különböző arányokban keverték. Ráadásul ezeknek a tanulmányoknak nem az volt a céljuk, hogy az interferenciát elemezzék. Vizsgálataink lényege ezzel szemben az volt, hogy olyan mintakeverékeket készítsünk, amelyekben két különböző ANA mintázat van jelen különböző, de ismert titerben, és összehasonlítsuk az elvárt és megfigyelt mintázat intenzitásokat. Ez nemcsak a mintázatok közötti interferencia észlelését tette lehetővé, hanem annak részletes elemzésére és jellemzésére is lehetőséget nyújtott. Ráadásul a kevert mintázatok számítógépes képelemzéssel és monitoron végzett értékelését össze tudtuk hasonlítani a konvencionális leolvasással. Tudomásunk szerint ezt a kísérleti elrendezést az ANA mintázatok közötti interferencia vizsgálatára más még nem alkalmazta.

Vizsgálatainknak van néhány korlátja. Először is, csak a két leggyakoribb ANA mintázat interferenciáját vizsgáltuk, a homogén nukleáris és finomszemcsés nukleáris mintázatot. Nagyon valószínű, hogy más ANA mintázattípusok egymásra kifejtett zavaró hatása eltérhet ettől. Másodszor, a két ANA-pozitív minta összekeverése megváltoztatja az idiotípus/antiidiotípus hálózatot, amely befolyásolhatja az autoantitestek reaktivitását, megváltoztatva a megfigyelt mintázatot. Harmadszor, az interferáló mintázatot tartalmazó mintából származó IgA és IgM osztályú antitestek - amit nem tudunk észlelni az anti-IgG-FITC konjugátummal - kapcsolódhatnak a HEp-2 sejtekhez és megváltoztathatják a vizsgált mintázatot okozó IgG osztályú autoantitestek kötődését. Ezt a potencióális problémát el lehetne hártani IgG osztályú antitestek izolálásával és használatával. Negyedszer, betegmintákat használtunk, amelyeket standard homogén és finomszemcsés mintázatra pozitív készítményekkel lehetne helyettesíteni. Még tisztább megközelítés lehetne monoklonális antitestek (pl. anti-dsDNA és anti-Ro60) keverése, de ezzel nem humán antitestek közötti interferenciát vizsgálnánk. Ötödször, a kevert mintázatú mintákat csak egyféle HEp-2 ANA reagenskészlettel teszteltük.

## Összegzés

**Háttér:** Az indirekt immunfluoreszcens teszt az egyik legrégebb óta autoantitestek kimutatására használt módszer. Számos előnye mellett hátránya, hogy a fluoreszcens képek kiértékelése bonyolult, időigényes feladat, mely a harmonizáció irányába tett lépések ellenére még mindig jelentős mértékben szubjektív. A kiértékelés automatizációja, számítógépes eljárások bevezetése a folyamat felgyorsítását, standardizálását, a variabilitás csökkentését, a szakértő idejének felszabadulását teheti lehetővé. A rutin diagnosztikába történő bevezetés feltétele viszont, hogy a számítógépes rendszer új eljárásai által nyújtott lehetőségeket és korlátokat megismerjük, az új kiértékelési módokat karakterizáljuk és összevessük az eddig használt hagyományos értékeléssel.

**Módszerek:** Vizsgálatainkban a EUROPattern fluoreszcens mikroszkópot használtuk antinukleáris (ANA) és anti-neutrophil citoplazmatikus antitest (ANCA) indirekt immunfluoreszcens tesztek számítógéppel támogatott kiértékelésére. Az ANCA diagnosztika területén kísér-gyulladásban, autoimmun betegségben és más gyulladásos kórállapot gyanúja vagy követése miatt a laboratóriumunkba küldött rutin minták sorozatán hasonlítottuk össze a képelemző és mintázatfelismerő algoritmus (EPa), illetve a képernyőn végzett értékelés eredményeit a hagyományos mikroszkópos kiértékeléssel. Az ANA vizsgálatok területén a HEp-2 sejteken látható autoantitest mintázatok közötti interferenciát vizsgáltuk és hasonlítottuk össze a különböző értékelési eljárásokat.

**Eredmények:** Az ANCA minták értékelése során mind a mintázatfelismerés, mind a mintázat intenzitásának reprodukálhatóságát megfelelőnek találtuk. A kép fényintenzitásán alapuló számítógépes titerbecslés 1:80 feletti értékeknél viszont nem mutatott lineáris összefüggést a végponti titerrel, erős pozitív C-ANCA mintáknál néhány esetben ráadásul jelentős alábecslést adott. Az 568 minta esetén összességében 86,1%-ban, negatív mintáknál 81,8%-ban, nemnegatív mintáknál 96,4%-ban adta meg a minősítést a képelemző algoritmus a hagyományos mikroszkópos leolvasásnak megfelelően. Képernyőn történő leolvasásnál a teljes

konkordancia 96,7%, míg az egyezés aránya a negatív és a nemnegatív esetek körében 95,3%, illetve 100% volt. Az ANCA mintázatot az EPa 69,0%-ban, a képernyőn végzett értékelés 95,1%-ban sorolta be helyesen.

A két leggyakoribb ANA mintázat egyidejű jelenléte esetén jelentős interferencia kialakulását demonstráltuk. A finomszemcsés magmintázat zavarja a homogén magmintázat felismerését, és fordítva. A homogén mintázat zavaró hatása miatt az esetek döntő többségében a szemcsés mintázat nem is látható, ha titere alacsonyabb, mint a homogén mintázaté. Egy második mintázat jelenlétében mind a homogén, mind a szemcsés mintázat felismerése és erősségének megítélése képernyőn végzett értékelésnél hasonló, számítógépes képelemzéssel rosszabb, mint hagyományos leolvasással.

**Következtetés:** A EUROPattern automatizált mikroszkópos rendszer ANA és ANCA tesztek esetén is alkalmas indirekt immunfluoreszcens lemezek humán értékelő által képernyőn végzett, számítógéppel támogatott kiértékelésére. Önállóan, felhasználói ellenőrzés nélkül az általunk vizsgált verziójú képelemző algoritmus nem használható eredmények kiadására, mivel rutin ANCA kivizsgálásra érkező és kevert ANA mintázattal rendelkező mintáknál mind a pozitív-negatív minősítés, mind a mintázatfelismerés terén teljesítményben elmaradt a referencia módszernek tekintett hagyományos mikroszkópos leolvasástól. Az egyetlen mintahígítás fluoreszcencia intenzitásából becsült titer meghatározás nem váltja ki a sorozathígításon alapuló titrálást. Az automatizált fluoreszcens mikroszkópok alkalmazásával elkerülhető a sötétszobában folyó munka, a papír alapú munkalisták használata, gyorsabbá tehető a kiértékelés és lehetséges a mintázatról készült képek eltárolása.

## Kulcsszavak

Indirekt immunfluoreszcens teszt; Anti-neutrofil citoplazmatikus antitest; Antinukleáris antitest; Automatizált mintázatfelismerés; HEp-2 indirekt immunfluoreszcens teszt; Interferencia; Kevert mintázat; Számítógéppel segített; Többszörös mintázat

## Új tudományos megállapítások

I. Az ANCA IIFT hagyományos, EUROPattern számítógépes képelemzéssel, illetve képernyőn végzett értékelésének összehasonlítása:

1. A mintázatok minősítésének és erősségének reprodukálhatósága megfelelő volt, a háromféle értékelés között jelentős eltérés nem volt.
2. A végponti titer becslés nem volt lineáris az eljárás mérési tartományán belül, ráadásul C-ANCA mintázatnál erősen pozitív mintáknál magas dózis hook-effektus is előfordult.
3. Az automatizált képelemzéses és a hagyományos értékelés között jelentős eltérés volt mind a minták minősítését, mind az osztályozását illetően, ezért a számítógépes algoritmus eredményei felhasználó ellenőrzés nélkül nem adhatók ki. A helytelen kvalitatív értékelés oka leggyakrabban negatív minták határérték pozitív atípusos ANCA-nak minősítése volt. A helytelen mintázatfelismerést többségében az ANA/ACyA pozitív minták nem megfelelő csoportba sorolása okozta.
4. A képernyőn végzett értékelés nagyon jó egyezést mutatott a referenciaként használt konvencionális mikroszkópos értékeléssel.

II. Az ANA mintázatok közötti zavaró hatás vizsgálata, a számítógéppel támogatott kiértékelési módok összehasonlítása:

1. A Laboratóriumi Medicina Intézetbe HEp-2 IIF vizsgálatra küldött minták körében gyakori, hogy egyszerre egynél több ANA mintázat látható, leggyakrabban a homogén és a szemcsés magmintázatok fordulnak elő együtt.
2. Kevert mintázatú mintáknál a homogén mintázat zavarja a szemcsés mintázatot és fordítva. A homogén mintázat zavaró hatása a nagyobb mértékű.
3. Zavaró második mintázat mellett a vizsgált mintázat felismerése és erősségének megítélése képernyőn végzett értékeléssel hasonló, számítógépes képelemzéssel rosszabb, mint hagyományos leolvasással.

## Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Antal-Szalmás Péternek, aki felügyelte és támogatta munkámat, segített a kísérletek megtervezésében és az eredmények értelmezésében.

Köszönöm Prof. Dr. Kappelmayer Jánosnak, hogy lehetőséget biztosított a DE Laboratóriumi Medicina Intézetében a PhD munkám elkészítésére.

Köszönöm †Szöllősi Ibolya, Török Gáborné, Vargáné Földesi Róza és az összes immunológiai részlegen dolgozó asszisztens precíz munkáját a kísérletes és rutin laboratóriumi tesztek elvégzésében.

Köszönöm a volt és jelenlegi szobatársaimnak, hogy fordulhattam hozzájuk a kisebb-nagyobb technikai problémáimmal, kiemelve Dr. Baráth Sándor és Dr. Mezei Zoltán statisztikai módszerek és Dr. Fejes Zsolt grafikonkészítés területén nyújtott segítségét.

Köszönöm az Euroimmun, illetve magyarországi forgalmazójának az Immunotrin Kft. munkatársainak, kiemelve közülük Dr. Frank Tibort, hogy a reagensek egy részét, a kipróbálás időszakában az automatizált mikroszkópot, illetve a műszerrel kapcsolatos információt biztosították.

Köszönöm a laboratóriumi informatikai rendszer üzemeltetőinek a statisztikai lekérdezésekhez nyújtott segítségüket.

Köszönöm az Immunológiai, Reumatológiai, Gasztroenterológiai és Nefrológiai Tanszék munkatársainak, hogy a betegek karakterizálásával, a rutin minták küldésével lehetővé tették a kísérletes munka elvégzését.

Köszönöm családomnak, szüleimnek és barátaimnak a türelmet, támogatást, amivel segítettek, hogy a kutatási munkára fókuszálhassak.



Nyilvántartási szám: DEENK/20/2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Dr. Nagy Gábor

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nagy, G.,** Földesi, R., Csipő, I., Tarr, T., Szűcs, G., Szántó, A., Bubán, T., Szekanecz, Z., Papp, M., Kappelmayer, J., Antal-Szalmás, P.: A novel way to evaluate autoantibody interference in samples with mixed antinuclear antibody patterns in the HEp-2 cell based indirect immunofluorescence assay and comparison of conventional microscopic and computer-aided pattern recognition.  
*Clin. Chim. Acta.* 553, 1-9, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2023.117747>  
IF: 5 (2022)
2. **Nagy, G.,** Csipő, I., Tarr, T., Szűcs, G., Szántó, A., Bubán, T., Sipeki, N., Szekanecz, Z., Papp, M., Kappelmayer, J., Antal-Szalmás, P.: Anti-neutrophil cytoplasmic antibody testing by indirect immunofluorescence: computer-aided versus conventional microscopic evaluation of routine diagnostic samples from patients with vasculitis or other inflammatory diseases.  
*Clin. Chim. Acta.* 511, 117-124, 2020.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.09.031>  
IF: 3.786

### További közlemények

3. Palatka, R., Janka, E. A., Soltész, L., Szabó, I. L., Kapitány, A., Dajnoki, Z., Emri, G., **Nagy, G.,** Palatka, K., Zouboulis, C. C., Szegedi, A., Gáspár, K.: Chronic inflammatory intestinal disorders in hidradenitis suppurativa.  
*Dermatology.* 239 (4), 592-600, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000530434>  
IF: 3.4 (2022)





4. Bonroy, C., Vercammen, M., Fierz, W., Andrade, L. E. C., Van Hoovels, L., Infantino, M., Fritzier, M. J., Bogdanos, D. P., Kozmar, A., Nespola, B., Broeders, S., Patel, D., Herold, M., Zheng, B., Chan, E. Y. T., Uibo, R., Haapala, A. M., Musset, L., Sack, U., **Nagy, G.**, Sundic, T., Fischer, K., Rego Sousa, M. J., Vargas, M. L., Eriksson, C., Heijnen, I. A., García-De La, T. I., Carballo, O. G., Satoh, M., Kim, K. H., Chan, E. K. L., Damoiseaux, J., Lopez-Hoyos, M., Bossuyt, X., European Federation of Laboratory Medicine (EFLM) Working Group "Autoimmunity Testing", European Autoimmunity Standardisation Initiative, International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns (ICAP): Detection of antinuclear antibodies: recommendations from EFLM, EASI and ICAP.  
*Clin. Chem. Lab. Med.* 61 (9), 1167-1198, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/ccim-2023-0209>  
IF: 6.8 (2022)
5. Bereczki, D., Nagy, B. J., Kerényi, A., **Nagy, G.**, Szarka, K., Kristóf, K., Szalay, B., Vásárhelyi, B., Bhattoa, H. P., Kappelmayer, J.: EDTA-Induced Pseudothrombocytopenia Up to 9 Months After Initial COVID-19 Infection Associated with Persistent Anti-SARS-CoV-2 IgM/IgG Seropositivity.  
*Lab. Med.* 53 (2), 206-209, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/labmed/lmab050>  
IF: 1.3
6. Hamar, A. B., Szekanez, Z., Karancsiné Pusztai, A., Czókolyová, M., Végh, E., Pethő, Z., Bodnár, N., Gulyás, K., Horváth, Á., Soós, B., Bodoki, L., Bhattoa, H. P., **Nagy, G.**, Tajti, G., Panyi, G., Szekanez, É., Domján, A., Hódosi, K., Szántó, S., Szűcs, G., Szamosi, S.: Effects of one-year tofacitinib therapy on bone metabolism in rheumatoid arthritis.  
*Osteoporosis Int.* 32 (8), 1621-1629, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-021-05871-0>  
IF: 5.071
7. Karancsiné Pusztai, A., Hamar, A. B., Horváth, Á., Gulyás, K., Végh, E., Bodnár, N., Kerekes, G., Czókolyová, M., Bodoki, L., Hódosi, K., Domján, A., **Nagy, G.**, Szöllősi, I., Lopez, L. R., Matsuura, E., Prohászka, Z., Szántó, S., Szűcs, G., Nagy, Z., Shoenfeld, Y., Szekanez, Z., Szamosi, S.: Soluble vascular biomarkers in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis: effects of one-year anti-TNF-[alfa] therapy.  
*J. Rheumatol.* 48 (6), 821-828, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.200916>  
IF: 5.346
8. Horváth, Á., Végh, E., Karancsiné Pusztai, A., Pethő, Z., Hamar, A. B., Czókolyová, M., Bhattoa, H. P., **Nagy, G.**, Juhász, B., Hódosi, K., Domján, A., Szekanez, Z., Szűcs, G., Szamosi, S.: Complex assessment of bone mineral density, fracture risk, vitamin D status and bone metabolism in Hungarian systemic sclerosis patients.  
*Arthritis Res. Ther.* 21 (1), 1-10, 2019.  
IF: 4.103





9. **Nagy, G.**: Laboratóriumi vizsgálatok.  
In: Reumatológia. Szerk.: Szekanecz Zoltán, Nagy György, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 87-98, 2019.
10. Sarang, Z., Sággy, T., Budai, Z., Ujlaky-Nagy, L., Bedekovics, J., Beke, L., Méhes, G., **Nagy, G.**, Rühl, R., Moise, A. R., Palczewski, K., Szondy, Z.: Retinol Saturase Knock-Out Mice are Characterized by Impaired Clearance of Apoptotic Cells and Develop Mild Autoimmunity. *Biomolecules*. 9 (11), 737, 2019.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/biom9110737>  
IF: 4.082
11. **Nagy, G.**: Immunológiai eltérések kimutatása laboratóriumi módszerekkel primer immunhiányos betegségekben.  
*Orv. hetil.* 158 (79), 2087-2094, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2018.31261>  
IF: 0.564
12. Szántó, A., Szabó, K., **Nagy, G.**, Molnár, C., Zeher, M.: Characterization and Comparison of Patient Subgroups Suspicious for IgG4-Related Disease and Malignant Lymphoma in Patients Followed-up for Sjögren's Syndrome.  
*Pathol. Oncol. Res.* 22 (3), 579-585, 2016.  
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12253-016-0041-1>  
IF: 1.736
13. Szántó, A., **Nagy, G.**, Molnár, C., Griger, Z., Tarr, T., Zeher, M.: Description of patients with IgG4-related disease from a Hungarian centre.  
*Scand. J. Rheumatol.* 43 (4), 334-337, 2014.  
IF: 2.527
14. Bodolay, E., Prohászka, Z., Paragh, G., Csipő, I., **Nagy, G.**, Laczik, R., Demeter, N., Zöld, É., Nakken, B., Szegedi, G., Szodoray, P.: Increased levels of anti-heat-shock protein 60 (anti-Hsp60) indicate endothelial dysfunction, atherosclerosis and cardiovascular diseases in patients with mixed connective tissue disease.  
*Immunol. Res.* 60, 50-59, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-014-8552-x>  
IF: 3.098
15. **Nagy, G.**: ACPA: citrullinált proteinek és peptidek elleni antitestek és jelentőségük a rheumatoid arthritis laboratóriumi diagnosztikájában.  
*Focus Med.* 15 (2), 33-40, 2013.





16. Szodoray, P., Nakken, B., Baráth, S., Csípő, I., **Nagy, G.**, El-Hage, F., Osnes, L. T., Szegedi, G., Bodolay, E.: Altered Th17 cells and Th17/regulatory T-cell ratios indicate the subsequent conversion from undifferentiated connective tissue disease to definitive systemic autoimmune disorders.  
*Hum. Immunol.* 74 (12), 1510-1518, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2013.08.003>  
IF: 2.282
17. Hajas, Á. H., Szodoray, P., Nakken, B., Gaál, J., Zöld, É., Laczik, R., Demeter, N., **Nagy, G.**, Szekanecz, Z., Zeher, M., Szegedi, G., Bodolay, E.: Clinical course, prognosis, and causes of death in mixed connective tissue disease.  
*J. Rheumatol.* 40 (7), 1134-1142, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.121272>  
IF: 3.173
18. Baráth, S., **Nagy, G.**, Zöld, É., Csípő, I., Gyimesi, E., Zeher, M., Bodolay, E.: Conductor of regulatory cells: does vitamin D restore the shifted balance of the distinct regulatory cell types in undifferentiated connective tissue disease?  
*Immunol. Lett.* 153 (1-2), 71-72, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2013.03.001>  
IF: 2.367
19. Tímár, O., Szekanecz, Z., Kerekes, G., Végh, J., Oláh, A., **Nagy, G.**, Csiki, Z., Dankó, K., Szamosi, S., Németh, Á., Soltész, P., Szűcs, G.: Rosuvastatin improves impaired endothelial function, lowers high sensitivity C-reactive protein, complement and immunocomplex production in patients with systemic sclerosis: a prospective case-series study.  
*Arthritis Res. Ther.* 15 (5), R105, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/ar4285>  
IF: 4.117

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 58,752**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,786**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományos ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.01.22.

