

# Opisi, indikacije in interpretacije imunoloških testov

Alojz Ihan (ur), Saša Simčič, Andreja N. Kopitar, Vladimir Kotnik, Jasmina Livk, Mojca Plankl, Sanja Stopinšek, Branka Wraber

## Testiranje imunskega sistema

### Testiranje protitelesne imunosti

Meritve koncentracije protiteles (razredov in podrazredov)

Meritve koncentracije cepilnih protiteles (Di, Te, Pneumo, HiB) v serumu in meritve porasta koncentracije cepilnih protiteles po cepljenju

Meritve koncentracije IgA v slini

### Analize limfocitnih populacij v krvi

Limfocitne populacije (T, B, Th, Tc, NK, akt.T - HLA DR)

Limfocitne populacije po okužbi s HIV

Limfogram (presejalno testiranje imunskega stanja)

Limfociti T - aktiviranost (ekspresija CD25, HLA DR, CD69, CD38) limfocitov v krvi

Limfociti T - diferenciacija

- Limfociti T - Naivne in spominske celice T pomagalk

- Limfociti T - Celice RTE - Recent Tymphic Emigrants

- Limfociti T - Celice TCR alfa/beta in TCR gama/delta DNT

- Limfociti T - Celice Th1/Th2/Th17

- Limfociti T - Regulatorni Treg1 (CD25+++ ) limfociti T v krvi

- Limfociti T - Regulatorni Th3 (TGF beta +) limfociti T v krvi ?

Limfociti B - diferenciacija

- Limfociti B - Nosilci mIgG, mIgA, mIgM

- Limfociti B - Naivni (CD27-) in spominski (CD27+) limfociti B

### Testiranje *in vitro* aktiviranih limfocitov in/ali monocitov (mononuklearnih celic)

### Testiranje komplementnega sistema

### Testiranje prirojenih motenj v delovanju fagocitnih celic

### Testiranje pokazateljev vnetja (nespecifičnega, septičnega, alergijskega)

### Določanje citokinov

Določevanje koncentracije citokinov in topnih receptorjev z metodo ELISA

Hitro (urgentno) določevanje koncentracije vnetnih citokinov v krvi z metodo CBA (rezultat v 24 urah)

### Testiranje avtoprotiteles v serumu

Revmatološko pomembna protitelesa in markerji

Paraneoplastična protitelesa

Antigangliozidna protitelesa

Protitelesa anti-MAG

### Testiranje navzočnosti nevtralizacijskih protiteles proti terapevtikom

### Alergenski testi - Specifični IgE in IgG proti različnim alergenom

Specifični IgE proti sezonskim inhalacijskim alergenom - pelodu

Specifični IgE proti drugim inhalacijskim alergenom (pršice, mikroorganizmi, pokožice in živalski proteini)

## **Specifični IgE proti neinhalačijskim alergenom (hrana, žuželke in njihovi strupi, zdravila, poklicni alergeni, paraziti)**

Specifični IgG proti alergenom plesni in perja ptičev iz domačega okolja pri diagnostiki alergijskega alveolitisa (farmarska pljuča)

## **BAT - Celični in vitro test aktivacije bazofilcev z alergeni**

### **Testi celične apoptoze in nekroze**

Analiza deleža celic s fragmentacijo DNA z metodo TUNEL  
Merjenje apoptotične izgube asimetrije membrane z aneksin V

### **Kvantifikacija matičnih CD34+ celic**

## **Specifično imunološko testiranje pri sumu na posamezne bolezni oz. patološka stanja**

Testiranje za nosilstvo molekul HLA B27 (ankilizirajoči spondilitis, revmatske bolezni)  
ALPS – avtoimunski limfoproliferativni sindrom  
IPEX (Imunska disregulacija, Poliendokrinopatija, Enteropatija, X-vezan sindrom)  
Hemofagocitni sindrom (limfohistiocitoza) - HFS  
CVID - Splošna variabilna hipogamaglobulinemija

## **Imunske tehnike za določanje mikrobnih in drugih antigenov**

### **Glivične okužbe**

Določanje protiteles proti glivam z imunodifuzijo  
Določanje protiteles IgA, IgM in IgG proti glivam *Aspergillus fumigatus* in *Candida albicans* z ELISA  
Določanje *Aspergillus spp.* galaktomanana z ELISA  
Določanje *Candida spp.* manana z ELISA  
Določanje protiteles proti mananskemu antigenu kandide z ELISA  
Določanje antigena *Cryptococcus neoformans* z ELISA  
Določanje glikoproteinskega antigena *C. albicans*  
Določanje (1→3)-β-D-glukana

### **Bakterijske okužbe**

RPR (Rapid Plasma Reagin) flokulacijski test za dokazovanje protiteles pri sifilisu  
FTA-ABS (Fluorescent Treponemal Antibody – ABSorption test) imunofluorescenčni test za dokazovanje protiteles pri sifilisu  
RANDOX-TPHA (Posredni hemaglutinacijski test za odkrivanje protiteles proti antigenom bakterije *Treponema pallidum* v serumu)  
INNO-LIA™\* Syphilis Score  
INNO-LIA™\* Syphilis Score-IgM

*Helicobacter pylori*-IgA (ELISA-HP IgA)  
*Helicobacter pylori*-IgG (ELISA-HP IgG)  
Določanje antigena *Helicobacter pylori* v blatu

Quantiferon gold(IT)- ugotavljanju celičnega imunskega odziva pri okužbi z bakterijo *Mycobacterium tuberculosis*

Določanje protiteles proti *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, B in C, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* newport in *Salmonella* Typhimurium

### **Drugo**

## Testiranje protitelesne imunosti

### Meritve koncentracije protiteles (razredov in podrazredov) v serumu

**Indikacije:** sum na prirojeno okvaro protitelesnega imunskega odziva.

**Vzorec:** 3,5 ml venske krvi brez antikoagulantov (serumski odvzem).

Testi:

- IgG
- IgA
- IgE
- IgM
- IgG-podrazredi (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)

### Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

**Imunoglobulini IgG, IgA, IgM** – Imunoglobuline tvorijo plazmatske celice kot humoralni imunski odziv na stik imunskega sistema z antigeni. Primarna reakcija po začetnem stiku je tvorba protiteles IgM, ki ji kasneje sledi tvorba IgG in tudi IgA protiteles. Kvantitativna determinacija imunoglobulinov daje pomembno informacijo o humoralnem imunskem stanju. Znižane koncentracije serumskih imunoglobulinov se pojavijo pri stanjih primarne imunske oslabiljenosti, kot tudi pri sekundarni imunski oslabiljenosti, npr.: pri naprednih malignih tumorjih, limfatični levkemiji, multiplem mielomu in Waldenstromovi bolezni. Povečane koncentracije serumskih imunoglobulinov se pojavijo pri poliklonski ali oligoklonski Ig proliferaciji, npr.: pri hepatičnih boleznih (hepatitis, ciroza jeter), pri akutnih in kroničnih vnetjih, avtoimunskih boleznih. Monoklonska imunoglobulinemija zahteva poleg kvantitativne determinacije tudi natančne diferencialne diagnostične preiskave. Lokalne imunske reakcije s centralnim živčnim sistemom povzročijo povišane koncentracije imunoglobulinov. Povišane koncentracije IgG v urinu so prisotne pri pacientih z neselektivno glomerularno proteinurijo.

Imunoglobulin IgE - je odgovoren za klinično sliko pri alergijah takojšnje preobčutljivosti. Serumske koncentracije IgE pri alergijskih boleznih, kot je atopični dermatitis ali astma na splošno, so povezane z intenziteto izpostavitve alergenu ter z resnostjo alergijskih simptomov. Determinacija IgE je zato zelo uporabna pri diagnozi alergijskih bolezni. Merjenje koncentracij IgE v serumu je predvsem pomembno v otroštvu za pridobitev predvidene ocene alergijskih simptomov.

IgG1–4 – Humana IgG protitelesa tvorijo štiri podrazrede IgG1, IgG2, IgG3 in IgG4. Razlike med IgG podrazredi se kažejo v različnih biološko pomembnih funkcijah, kot je prepoznavanje antigenov, komplementna aktivacija ter vezava receptorjev na celičnih površinah.

Podrazredi IgG so zaradi strukturne različnosti učinkoviti proti različnim vrstam antigenov: IgG1 in IgG3 se učinkovito vežejo na proteinske antigene in se tvorijo v odvisnosti od limfocitov T(CD4); od teh IgG3 najbolj učinkovito aktivira komplement in omogoča opsonizacijo. IgG2 se vežejo na

polisaharidne antigene (npr. bakterijske kapsule) in se tvorijo neodvisno od limfocitov T (CD4). IgG1 in/ali IgG3 deficit se kaže kot kronične in ponavljajoče okužbe spodnjih dihal, IgG2 in/ali IgG4 deficit pa se kaže kot ponavljajoče okužbe sinusov in srednjega ušesa s kapsuliranimi bakterijami (pnevmokoki, hemofilusi).

Zmanjšanja koncentracija IgG1 je verjetneje posledica splošne imunske oslabiljenosti kot pa specifične oslabiljenosti podzreda. Selektivna oslabiljenost IgG2, ki je vidna pri večji prisotnosti virusnih in bakterijskih infekcij, kaže na slabo delovanje imunskega odziva. Nizke koncentracije IgG2 so prisotne v serumu pacientov z infekcijo zgornjih dihalnih poti ter bronhopulmonarnih infekcijah. Nizke koncentracije IgG1 in IgG2 so izmerili pri nefrotičnem sindromu ter delno pri nefritisu. IgG3 oslabiljenost je prisotna pri virusnih infekcijah urinarnega trakta. Pacienti s kroničnimi bronhopulmonarnimi boleznimi in bronhiektazijo imajo zelo nizke koncentracije IgG4 v serumu. Spremembe v koncentracijah podzredov IgG so prisotne tudi pri pacientih z avtoimunskimi boleznimi, nevrološkimi sindromi in HIV infekcijo.

Dokazovanje IgD v krvi je poleg značilne klinične slike osnova za diagnozo avtosomnega recesivnega sindroma periodične vročice in hiperimunoglobulinemije D (HIDS). Količina IgD v krvi ni povezana z resnostjo in pogostnostjo napadov bolezni.

**Prirojene motnje v koncentraciji serumskih protiteles** so najpogostejši vzroki prirojenih imunskih deficitov. V prvi fazi jih testiramo z določitvijo koncentracije posameznih razredov protiteles (IgG, IgM, IgA, IgE) v serumu. Uspešna tvorba protiteles zajema številne stopnje imunskega odziva (makrofage, celice T pomagalke, limfocite B). Zato koncentracija protiteles v serumu lahko pokaže pomanjkljivosti na številnih stopnjah imunskega odziva. Preiskava je diagnostična za dedne motnje: Agamaglobulinemija, Splošna variabilna hipogamaglobulinemija (angl. Common Variable Immunodeficiency, CVI), Hiper IgM-sindrom, Pomanjkanje IgA.

### **Meritve koncentracije cepilnih protiteles (Di, Te, Pneumo, HiB) v serumu in meritve porasta koncentracije cepilnih protiteles po cepljenju**

*In vitro* kvantitativno določanje koncentracije cepilnih protiteles z ELISA v človeškem serumu je preiskava, ki pokaže zmožnost protitelesnega odziva in preiskava s katero preverjamo uspešnost cepljenja ali zaščitno koncentracijo protiteles in potrebo po revakcinaciji.

**Indikacije:** sum na prirojeno okvaro protitelesnega imunskega odziva, preverjanje uspešnosti cepljenja in/ali zaščitnega nivoja protiteles za oceno potrebnosti ponovnega cepljenja (npr. po cepljenju imunodeficitnih, izpostavljenost okužbi ob zastaranem ali nejasnem cepljenju).

**Vzorec:** 3,5 ml venske krvi brez antikoagulantov (serumski odvzem).

#### Testi:

- Difterija antitoksinska protitelesa
- Tetanus antitoksinska protitelesa
- *Haemophilus influenzae* B antikapsularna protitelesa
- *Streptococcus pneumoniae* IgG antikapsularna protitelesa

## Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

**Porast koncentracije cepilnih protiteles po cepljenju** je preiskava, ki zelo občutljivo pokaže zmožnost protitelesnega odziva proti proteinskim antigenom (Di, Te) in proti polisaharidnim antigenom (Pneumo, HiB). Odvzamemo serum bolnika pred cepljenjem (ugotovitev bazičnega nivoja specifičnih protiteles) in 4 tedne po cepljenju (ugotovitev porasta nivoja specifičnih protiteles).

**Preverjanje uspešnosti cepljenja in/ali zaščitnega nivoja protiteles za oceno potrebnosti ponovnega cepljenja.** V primeru cepljenja imunsko oslabljenih posameznikov je smiselno preveriti uspešnost cepljenja in oceniti, če je nastal zaščitni nivo protiteles. Podobno je primerno preveriti potrebo po revakcinaciji v primeru, da je izpostavljenost okužbi nastala že dolgo časa po zadnjem cepljenju.

## Meritve koncentracije IgA v slini

**Indikacije:** Sum na prirojeni deficit IgA (pogosti respiratorni infekti), sum na nedozorelost črevesne sluznice (skupaj z merjenjem IgG v slini), sum na sekundarni imunski deficit.

**Vzorec:** 1 ml sline (Odvzem: preiskovanec si usta 3 min spira s čisto vodo; nato si z žvečenjem (parafinskega traka (parafilm) stimulira nastanek sline, ki jo v količini 1 ml izpljune v čisto posodo (kozarček za urin, likvor ipd.).

Test:

-IgA v slini

## Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

**IgA v slini** so najpomembnejša protitelesa za zaščito sluznic pred okužbami. IgA se pri novorojencu začne ob mikrobnih stimulacijah tvoriti najprej v slinavkah (čez teden ali dva), kasneje pa v črevesju (čez mesec ali dva), pojav IgA je dobro merilo razvoja sluznične imunosti. Pomanjkanje IgA je najpogostejši prirojeni imunski deficit (1/600 ljudi), hkrati je zmanjšana sinteza IgA med prvimi znaki sekundarnih imunskih deficitov (zaradi imunosupresije, pomanjkanja hranil, stresov), ker protitelesa s sluzjo stalno odstranjujejo in je njihova koncentracija odvisna od stalne produkcije. Koncentracija IgA v slini je neposredno povezana z občutljivostjo za nastanek respiratornih okužb in okužb prebavil.

## Analize limfocitnih populacij v krvi

### Meritve koncentracije limfocitnih populacij s pretočno citometrijo

**Indikacije:** sum na prirojeno ali pridobljeno okvaro celičnega imunskega odziva, spremljanje okužbe s HIV, ocenjevanje imunskega stanja.

**Vzorec:** 2-3 ml (minimalno 0,5 ml) venske krvi, odvzete v epruveto za vakuumski odvzem z antikoagulantom (heparin ali EDTA). Test izvedemo najkasneje v 48 urah po odvzemu krvi.

### Princip in omejitve metode

Preiskave temeljijo na vezavi monoklonskih protiteles na površinske levkocitne antigene (CD antigeni) limfocitov v vzorcu polne krvi. Monoklonska protitelesa proti specifičnim CD antigenom so označena z različnimi fluorokromi, zato lahko isti vzorec krvi hkrati označimo z različnimi monoklonskimi protitelesi. Določanje limfocitnih populacij s pretočnim citometrom je v osnovi enako metodi fluorescenčne mikroskopije, vendar je odčitavanje odstotka obarvanih celic avtomatizirano, hitrejše in objektivnejše. Za analizo s pretočnim citometrom potrebujemo celice v suspenziji.

#### Testi:

- Limfocitne populacije (T, B, Th, Tc, NK)
- Limfocitne populacije po okužbi s HIV
- Limfogram (presejalno testiranje imunskega stanja)
- Limfociti T - aktiviranost (ekspresija CD25, HLA DR, CD69, CD38) limfocitov v krvi
- Limfociti T - diferenciacija
- Limfociti T - Naivne in spominske celice T pomagalk
- Limfociti T - Celice RTE - Recent Tymphic Emigrants
- Limfociti T - Celice Th1/Th2/Th17
- Limfociti T - Regulatorni Treg1 (CD25+++ ) limfociti T v krvi
- Limfociti T - Regulatorni Th3 (TGF beta +) limfociti T v krvi
- Limfociti T - DNT (dvojno negativni CD4- CD8- alfa/beta TCR+ limfociti T)
- Limfociti B - diferenciacija
- Limfociti B - Nosilci mIgG, mIgA, mIgM
- Limfociti B - Naivni (CD27-) in spominski (CD27+) limfociti B

## Limfocitne populacije (T, B, Th, Tc, NK)

Preiskava je namenjena določitvi deležev in absolutnih vrednosti posameznih limfocitnih podvrst. Omogoča opredelitev imunskih pomanjkljivosti, malignih, infekcijskih in avtoimunskih bolezni.

Limfocite na osnovi prepoznavanja antigenov in funkcije razdelimo v tri podvrste.

**Limfociti T** so vključeni v celično posredovane imunske odzive pridobljene imunosti. Na površini limfocitov T je TCR kompleks, ki ga sestavljajo T-celični receptor (TCR), CD3 in  $\zeta$  veriga. Glede na funkcijo ločimo celice T pomagalke (CD4<sup>+</sup>) in citotoksične limfocite T (CD8<sup>+</sup>). Aktivacijo limfocitov T spremlja izražanje številnih antigenov, med katerimi so tudi antigeni HLA-DR.

**Limfociti B** se po aktivaciji z antigenom postopno diferencirajo v plazmatke, ki sintetizirajo in izločajo protitelesa, specifična za prepoznani antigen. Limfociti B na svoji površini poleg B-celičnega receptorja (BCR) izražajo tudi koreceptorški kompleks, katerega del je tudi CD19.

**Naravne celice ubijalke (NK celice)** prepoznavajo in uničijo okužene ali maligno transformirane celice. Poleg tega so pomemben vir IFN- $\gamma$ , ki aktivira makrofage. NK celice na svoji površini med drugim izražajo molekule CD16 in CD56.

**Interpretacije:** Prirojene imunske pomanjkljivosti, ki se kažejo predvsem kot motnje v koncentraciji posameznih limfocitnih populacij v krvi, so:

*Težka sestavljena imunska pomanjkljivost (SCID – Severe Combined Immunodeficiency)* je skupina najtežjih oblik prirojene imunske pomanjkljivosti. Med SCIDi ločimo:

1. SCID brez limfocitov T, limfociti B so v krvi (mutacija gena za receptor IL-2 (najpogostejša oblika), JAK3, receptor IL-7, tirozin fosfatni receptor C. V vseh primerih se pojavljajo maloštevilni limfociti T, limfociti B so nezreli, koncentracija imunoglobulinov je zelo majhna.

2. SCID brez limfocitov T in B: Vzrok so različne genske okvare: rekombinantnega gena RAG 1 ali RAG 2, mutacija gena Artemis, mutacija gena za encim adenzin deaminazo (ADA).

Pri vseh oblikah SCID se bolezenski znaki začnejo pojavljati kmalu po rojstvu (oportunistične okužbe z glivami, virusi, paraziti).

Mutacija ZAP70 kinaze se kaže kot odsotnost limfocitov T CD8. Mutacija purin nukleozidne fosforilaze (PNP) se kaže kot zmanjšana koncentracija limfocitov T zaradi kopičenja toksičnih produktov v limfocitih T.

*DiGeorgejev sindrom* – hipoplazija priželjca (razvojna okvara). V krvi pomanjkanje limfocitov T, če je hipoplazija priželjca izrazita, pa odsotnost limfocitov T povzroči tudi pomanjkljivo aktivacijo limfocitov B in znižane koncentracije serumskih imunoglobulinov.

*Nezelofov sindrom* – hipoplazija priželjca (dedna okvara). V krvi manj limfocitov T, razmerje CD4/CD8 je ohranjeno, koncentracija in aktivacija limfocitov B normalna, koncentracije serumskih imunoglobulinov normalne.

## Limfociti T – diferenciacija

Limfociti T – diferenciacija je set preiskav, ki bolj celostno prikaže dozorevanje in diferenciacijo limfocitov T. Gre za set posameznih preiskav.

Izvedemo sledeče preiskave:

- Limfocitne populacije
- Limfociti T - Naivne in spominske celice T pomagalke
- Limfociti T - Celice RTE - Recent Tymphic Emigrants
- Limfociti T - Celice TCR $\alpha/\beta$  in TCR $\gamma/\delta$  DNT
- Limfociti T - Celice Th1/Th2/Th17
- Limfociti T – Regulatorni Treg1 (CD25++)

**Limfociti T**, nosilci celične imunosti, nastajajo v kostnem mozgu kot nezrele, nefunkcionalne celice T. V zrele imunokompetentne limfocite T (celice T pomagalke – CD4+CD3+ in citotoksične celice T - CD8+CD3+) dozoriijo v timusu. Njihovo dozorevanje spremljata aktivacija in preurejanje genov za T-celični receptor (CD3). Limfociti T, ki dozoriijo v timusu, se kot naivni limfociti T (CD45RA) izplavijo v kri. Naivni limfociti T se nato v bezgavkah razmnožujejo brez stimulacije z antigeni. Ob teh delitvah izgubljajo delčke genoma, ki jim je med dozorevanjem v timusu služil za oblikovanje antigenskega receptorja (TREC T-cell receptor excision circles). Naivni limfociti T, ki TREC še imajo, se imenujejo celice RTE (Recent Tymphic Emigrants).

**Celice RTE**, ki jih prepoznamo tudi s protitelesi CD31, so nedavno zapustile timus. Njihova koncentracija je dobro merilo za timusno proizvodnjo limfocitov T. Celice RTE so zato dober pokazatelj obnavljanja limfocitov T po transplantaciji kostnega mozga.

**Naivni (CD45RA) limfociti T** so ob poliklonski in vitro stimulaciji nezmožni produkcije IFN- $\gamma$ , vendar so največji producenti IL-2; imajo CD62L za ustavljanje v bezgavkah, nimajo pa CCR7 za prehod v plaščno cono bezgavk. Ob vnetni aktivaciji v bezgavkah adherirani naivni limfociti T (CD62L+) pridobijo CCR7 in preidejo v plaščno cono bezgavk. V primeru aktivacije z antigenom postanejo **spominski (CD45RO) limfociti T**.

### Limfociti T - Celice Th1/Th2/Th17

Med spominskimi limfociti ločimo različno diferencirane limfocite CD4 (Th), ki vsak na svoj način izdelujejo citokine in usmerjajo imunski sistem v različne oblike imunskih odzivov. **Limfociti Th1** usmerjajo odziv v citotoksični imunski odziv, **limfociti Th2** pa v protitelesni imunski odziv. **Limfociti Th17** močno spodbudijo protibakterijski in protiglivični imunski odziv v sluznicah in koži, s tem da spodbujajo protimikrobno dejavnost nevtrofilcev in epiteljskih celic. Pomanjkanje Th17 vodi v kronične bakterijske in glivične okužbe kože in sluznic, njihov povečan delež pa v nastanek avtoimunosti. Četrta možna diferenciacija spominskih celic T pomagalk so **regulatorni limfociti T (Treg)**, ki specifično zavirajo imunski odziv proti določenim antigenom in so osnova imunske tolerance. Celice Treg so populacija limfocitov T, ki regulira aktivacijo drugih limfocitov T. Nujne so za vzdrževanje tolerance na lastne antigene (preprečevanje avtoimunosti). Zavirajo imunski odziv potem, ko je boj s tujimi antigeni uspešno končan. Poznanih je več vrst regulatornih celic. Tiste, ki izražajo transmembranski glikoprotein CD8+, tiste, ki izražajo CD4, CD25, FoxP3 in še druge celice, ki zavirajo prekomeren imunski odziv. Večina celic Treg je CD4+ in večinoma konstitutivno izražajo CD25 alfa verigo IL-2 receptorja (celice CD25++CD4+) in transkripcijski faktor FoxP3.



Delež regulatornih limfocitov v krvi je pogosto značilno zmanjšan pri avtoimunosti. Ločimo **Treg1** (Tr1 cells), ki nastanejo v timusu kot odgovor na avtoantigene. Po aktivaciji z antigenom močno izrazijo CD25 (CD25++ limfociti T), ki je tudi njihov marker za določanje v krvi.

Celice v vzorcu polne krvi stimuliramo z ionomicinom (IONO) in forbol 12-miristat 13-acetatom (PMA). Po končani inkubaciji vzorec označimo z monoklonskimi protitelesi proti specifičnim antigenom na površini celic (CD4) in v celicah (IFN- $\gamma$ , IL-4 in IL-17A). Označene celice v suspenziji analiziramo s pretočnim citometrom.

Diferenciacija naivnih celic CD4 vodi v različne efektorske in spominske podvrste celic T, ki proizvajajo različne citokine. Funkcionalne podvrste celic CD4 tako razlikujemo glede na izločanje citokinov.

**Celice Th1** proizvajajo večje količine IFN- $\gamma$ . Preko izločanja IFN- $\gamma$  in drugih efektorskih molekul celice Th1 aktivirajo makrofage, naravne celice ubijalke (NK) in citotoksične celice (CD8); odgovorne so za celično posredovano imunost. Te celice so pomembne za zaščito pred znotrajceličnimi bakterijami, glivami, praživalmi in virusi, pomembne so tudi pri nekaterih avtoimunskih odzivih.

**Celice Th2** proizvajajo večje količine IL-4, ki je posebno močan pri usmerjanju limfocitov B v IgE producirajoče celice. Celice Th2 sodelujejo pri obrambi proti zunajceličnim parazitom, lahko pa povzročijo tudi škodljive alergične reakcije.

**Celice Th17** z izločanjem IL-17A in drugih faktorjev aktivirajo nevtrofilce in regulirajo imunski odziv proti zunajceličnim bakterijam in glivam. Celice Th17 se povezuje tudi z avtoimunskimi odzivi.

**Celice Th3** so regulatorne celice, ki nastanejo na periferiji po aktivaciji na APC, njihov marker je citoplazemski marker TGF $\beta$ -(celice T - TGF $\beta$ +).

Poleg razvojnih/diferencijskih stopenj limfocitov T lahko v krvi ugotavljamo tudi nekatere involutivne/starostne oblike limfocitov T. **Celice DNT (dvojno negativni CD4- CD8- limfociti T)** nastanejo po številnih z vnetnimi citokini spodbujenih delitvah. Pri tem izgubijo možnost aktivacije s peptidnimi antigeni (preko MHC) in izločajo pretežno regulatorne citokine (npr. pri ALPSu). Ohranijo pa zmožnost aktivacije, posredovane z neproteinskimi antigeni (sladkorji, lipidi), vezanimi na imunoglobuline CD1+ podskupine limfocitov B. V tem primeru lahko stimulirajo limfocite B k nastajanju anti-lipidnih in anti-glikozidnih protiteles in s tem prispevajo k patogenezi avtoimunskih bolezni (npr. SLE). **Limfociti T s TCRalfa/beta in brez CD4 ali CD8 (alfa/beta DNT)** so limfociti T (normalno jih je do 4%), ki sicer nastajajo v večjih količinah v primeru kroničnih aktivacij imunskega sistema – na primer pri avtoimunskih boleznih ali avtovnetnih boleznih. Alfa/beta DNT se pojavijo tudi pri starostnikih in so verjetno posledica upadlega delovanja običajnih limfocitov T in s tem posredno kažejo na staranje imunskega sistema. **Limfociti T s TCR gama/delta in brez CD4 ali CD8 (gama/delta DNT)** so tudi pogosti pri starostnikih in so involutivni, zaradi številnih delitev izčrpani običajni gama/delta limfociti T, ki se niso zmožni več odzivati na tujke, pač pa delajo veliko količino citokinov za zaviranje imunskega odziva (IL-10). Gama/delta DNT nastajajo v večjih količinah v primeru kroničnih aktivacij imunskega sistema. Povečana količina DNT je torej znak kroničnega imunskega pogojenega vnetja, ki tudi močno pospešuje procese staranja. Poleg celic DNT so pri starostnikih pogosti tudi **CD4/CD8 dvojno pozitivni limfociti T (CD4/CD8 limfociti T)**. Ti limfociti izločajo predvsem citokin IFN-  $\gamma$  in se občasno pojavijo tudi pri zdravih ljudeh, bolj pogosto pa pri kroničnih vnetnih boleznih, kroničnih virusnih okužbah in tumorjih. Med involutivne celice, ki niso več zmožne replikacije, štejemo tudi limfocite T, ki nimajo molekule CD28 (CD3+CD28-).

## Limfociti B - diferenciacija

Preiskava kvantificira razvojne stopnje limfocitov B od prihoda iz kostnega mozga do diferenciacije v plazmatke. Limfociti B nastanejo v kostnem mozgu. Kot funkcijsko nedozorele celice (CD21-CD19+) pridejo v kri. Z izražanjem CD21 postanejo funkcijsko zreli, naivni limfociti B (CD27-IgM+IgD+CD19+), ki jih imenujemo tudi nepreklopljeni (non-switched) spominski limfociti B. Po prvem prepoznanju antigena izrazijo CD27, ki je marker za spominske limfocite B. Ob tem izgubijo IgD in postanejo »zgolj IgM pozitivni spominski limfociti B« (CD27+IgM+IgD-CD19+). Ob navzočnosti antigena se diferencirajo v tranzicijske limfocite B (CD38+IgM+CD19+) in nato v plazmablaste (CD38+IgM-CD19+), ki že tvorijo protitelesa IgM.

Ob ponovni aktivaciji spominskih limfocitov B (CD27+IgM+IgD-CD19+) se ob pomoči limfocitov Th sinteza imunoglobulinov razreda IgM preklopi v sintezo imunoglobulinov razreda IgG, IgA ali IgE. Nastanejo »polno preklopljeni (class-switched) spominski limfociti B (CD27+IgM-IgD-CD19+), ki se ob persistenci antigena diferencirajo v tranzicijske celice B in plazmablaste (CD38+CD19+), nato pa v bezgavkah in tkivih v plazmatke (CD38+CD19-).

Preiskava se uporablja kot presejalni test za CVID (splošna variabilna hipogamaglobulinemija) in za hiper IgM sindrom. Primerna je tudi za ocenjevanje vzpostavljanja populacij limfocitov B po presaditvi krvotvornih matičnih celic ali kostnega mozga. Prav tako se lahko uporablja za spremljanje vpliva specifičnih imunoterapij (vplivajo le na populacije limfocitov B), za zdravljenje nekaterih limfomov, levkemij in avtoimunskih bolezni. V preiskavo je poleg diferenciacije limfocitov B vključeno tudi določanje limfocitnih populacij.

*Splošna variabilna hipogamaglobulinemija* (angl. common variable immunodeficiency, CVID) je delno pomanjkanje vseh razredov protiteles. To je razmeroma pogosta dedna imunska pomanjkljivost (1:25000 – 1: 50000), ki se kaže s pogostimi pljučnicami, prebavnimi motnjami in povečano nagnjenostjo za razvoj avtoimunskih bolezni. Klinične težave se začnejo bodisi v zgodnjem otroštvu bodisi med 15. in 40. letom starosti. Gre za skupino različnih dednih okvar na ravni aktivacije celic T pomagalk (zmanjšano izločanje citokinov) in limfocitov B. Ker ne gre za eno samo vrsto genske okvare, so tudi pojavne oblike bolezni različne. Bolniki imajo zmanjšane krvne koncentracije protiteles, normalno ali zmanjšano število limfocitov B (CD19) in včasih tudi celic T pomagalk (CD4), obenem pa pogosto povečane krvne koncentracije citotoksičnih limfocitov T (CD8). Pogosto je tudi zmanjšano razmerje celic CD4/CD8 (<1) in zmanjšana koncentracija naivnih (CD45RA) celic T pomagalk. Zaradi naštetih motenj je pri CVID praviloma okvarjena pomoč limfocitov T pri pozni diferenciaciji limfocitov B (vloga ICOS), zato je nenormalna tvorba spominskih limfocitov B in izotipski prekop.

*Imunodeficienca s povišanim IgM* nastane zaradi mutiranega gena za protein CD40 na limfocitih B ali mutiranega gena za njegov ligand CD40L na limfocitih T, kar normalno omogoča prekop protitelesne sinteze z IgM na ostale razrede imunoglobulinov. Ljudje s hiper IgM sindromom imajo defekte v izotipskem preklopu, ki vodi v znižano koncentracijo polno preklopljenih spominskih celic B. Bolniki imajo pomanjkanje IgG in IgA, vendar sintetizirajo velike količine poliklonalnih IgM. B celice ne morejo preklopiti od IgM do IgG, IgA in IgE sinteze, ki se normalno pojavi pri dozorevanju B celic. Koncentracije posameznih limfocitnih populacij v krvi so normalne, le pri otrocih je razmerje celic CD4/CD8 navadno precej povečano. Na aktiviranih celicah T je lahko zmanjšana ali odsotna ekspresija CD154 (CD40L), kar se dokazuje v in vitro stimulacijskem testu.

### **Referenčni dokument**

- Warnatz K., Denz A., Dräger R., et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+IgM-IgD-) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002; 99(5): 1544-1551.
- B-Cell Phenotyping Profile for Immunodeficiency and Immune Competence Assessment, *Blood*. Dosegljivo na URL: <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretiv%20%20e/88800>. Pridobljeno: 13.09.2011.
- Ihan A. 1999. Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom. *Kranj, Kemomed*: 54 str.
- Givan A.L. 1992. *Flow Cytometry: First Principles*, New York: Wiley-Liss: 15 -103.
- HHS Publication (CDC, NIH), *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5th Edition, December 2009; Section II: 8-16

## Testiranje *in vitro* aktiviranih limfocitov in/ali monocitov (mononuklearnih celic)

**Indikacije:** sum na prirojeno ali pridobljeno okvaro T-celičnega imunskega odziva, sum na prirojeno okvaro receptorjev TLR na monocitih/makrofagih, spremljanje vnetnih stanj in bolezni.

**Vzorec:** 3,5 - 7 ml - kri z EDTA , 7- 10 ml krvi z EDTA za TLR testiranje in za določanje deficita IRAK-4

### Testi:

- *In vitro* aktivacija limfocitov (TAL) z mitogeni in antigeni
- Aktivacija *in vitro* in določitev ekspresije aktivacijskih markerjev na limfocitih (CD25, HLA DR, CD69)
- Produkcija citokinov *in vitro*: aktivacija PBMC s poliklonskimi aktivatorji *in vitro* – izločanje citokinov in drugih mediatorjev imunskega odziva in vnetnega odziva (IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-6, IL-8, , TNF- $\alpha$ , in drugi)
- Limfociti – blastno preoblikovanje – BrdU in Edu
- TLR testiranje– Stimulacija mononuklearnih celic z agonisti receptorjev TLR: Presejalni test – IL-6 odziv na PHA, OKT3, tetanus, polio, PPD; Specifični testi – IL-6 odziv po stimulaciji s SAC, LPS, Pam2, Pneumo R6, Pneumo 8450, PMA/iono; IL-10 odziv po stimulaciji s TNFalfa, PMA/IONO-
- Test za ugotavljanje deficita IRAK- 4

### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

#### Aktivacija limfocitov (TAL) *in vitro* z mitogeni in antigeni

Test je namenjen ugotavljanju zmožnosti limfocitov T, da se odzovejo na spodbudo z mitogeni (PHA, ConA, PWM in LPS) in antigeni (PPD, borelijski antigeni). V preiskovančevi krvi ugotavljamo navzočnost reaktivnih limfocitov T. Navzočnost IFN $\gamma$ , ki je nastal kot posledica aktivnosti spodbujenih limfocitov T merimo s prilagojenim EIA testom.

Test nadomešča test blastnega preoblikovanja limfocitov (LTT) z mitogeni. Test je hiter in temelji na predpostavki, da se limfociti T v navzočnosti mitogena aktivirajo in sintetizirajo IFN $\gamma$ . Iz količine IFN $\gamma$  v vzorcu sklepamo na moč odziva. Mitogeni, ki jih uporabljamo za spodbujanje preiskovančevih limfocitov so enaki tistim, ki smo jih uporabljali pri dosedanjem testu blastnega preoblikovanja, to sta PHA (phytohaemagglutinin) in ConA (concanavalin A) in mešanica, ki jo uporabljamo kot pozitivno kontrolo pri testu Quantiferon Gold IT. Mitogena PWM in LPS testiramo le na posebno željo naročnika.

#### Blastno preoblikovanje

Test transformacije limfocitov (angl. The lymphocyte transformation test - LTT) je *in vitro* test, ki temelji na dejstvu, da se limfociti ("spominske celice") po stiku z določenim antigenom preoblikujejo v blastne celice in proliferirajo po ponovni izpostavitvi enakemu antigenu. Proliferacijo limfocitov lahko določimo z merjenjem vgraditve radioaktivno označenega [3H]-timidina v podvojeno DNK. Ta postopek je počasen in ima več omejitev, vključno z obdelavo in odlaganjem radioaktivnih izotopov in

potrebo po dragi opremi. Uveljavljena alternativa te metode je uporaba bromodeoksiuridina (Brd) in 5-etinil-2'-deoksiuridina (Edu), ki sta analoga timidina. Vgradita se v novo sintetizirano verigo DNK aktivno delečih celic. Po delni denaturaciji dvoverižne DNK ju zaznamo imunokemično. Tako lahko ocenimo populacijo celic, ki aktivno sintetizirajo DNK.

Ta metoda se danes uporablja za oceno funkcije limfocitov, kot tudi za dokazovanje preobčutljivosti bolnikov na zunanje antigene (infekcijske agense, alergene) ali na avtoantigene (avtoimunske bolezni). V zadnjih 40 letih se je ta test izkazal za koristnega, še posebej pri diagnozi alergijskih obolenj, do katerih lahko pride po uporabi določenih zdravil. Test blastnega preoblikovanja lahko uporabljamo tudi za določanje preobčutljivosti na nekatere kovine, predvsem na berilij.

Test je občutljiv, hiter in enostaven za izvedbo. Tako lahko poleg ocene razmnoževanja (proliferacije) celic pridobimo tudi informacije o številu celic, morfologiji in analizi celičnih antigenov. Test ima tudi veliko prednost pred kožnimi testi, saj se z njegovo uporabo izognemo izpostavljanju ljudi kovinam tekom samega testiranja, kar lahko poslabša stanje ali pa celo povzroči preobčutljivost.

#### Test za določanje delovanja receptorjev TLR

Preiskava je namenjena obravnavi bolnikov s ponavljajočimi se okužbami, zaradi morebitnih genetskih defektov, ki so povezani z delovanjem receptorjev TLR.

Iz venske krvi bolnika in zdrave kontrole izoliramo mononuklearne celice iz periferne krvi (PBMC) in jih *in vitro* spodbujamo z mitogeni: Pam3CSK4 (sintetičnim triaciliranim lipopeptidom; ligandom TLR1/TLR2), Pam2CSK4 (sintetičnim diaciliranim lipopeptidom; ligandom TLR2/TLR6), Poly(I:C) (sintetičnim analogom dsRNA; ligandom TLR3), LPS (lipopolisaharidom; ligandom TLR4), FLA (flagelinom; ligandom TLR5), CL097 (derivatom imidazokinolinske spojine R848; ligandom TLR7/8) ali CpG (CpG oligodeoksinukleotidom; ligandom TLR9). Po inkubaciji z encimsko-immunskim testom ELISA ali s pretočno citometrijo v celičnih supernatantih določimo koncentracijo IL-6. Sintezo citokina IL-6 v bolnikovih PBMC po *in vitro* spodbujanju z mitogeni primerjamo z zdravo kontrolo.

#### Test za ugotavljanje deficita IRAK-4

Preiskava je namenjena ugotavljanju deficita IRAK-4 pri obravnavi bolnikov s ponavljajočimi se invazivnimi bakterijskimi okužbami, ki jih v glavnem povzročajo *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* in *Pseudomonas aeruginosa*, ali z neinvazivnimi bakterijskimi okužbami, kot so kožne okužbe s *Staphylococcus aureus* in okužbe ušes, nosu in grla s *Pseudomonas aeruginosa*.

Po spodbujanju z mitogeni (Pam2CSK4 (sintetičnim diaciliranim lipopeptidom; ligandom TLR2/TLR6), LPS (lipopolisaharidom; ligandom TLR4), FLA (flagelinom; ligandom TLR5), IL-1 $\beta$ , IONO/PMA (ionomicinom in forbol-12-miristat-13-acetatom; poliklonskima aktivatorjema) ali TNF- $\alpha$ ) in 48-urni inkubaciji z encimsko-immunskim testom ELISA ali s pretočno citometrijo v celičnih supernatantih določimo koncentracijo IL-6 in IL-10. Sintezo citokinov v bolnikovih PBMC primerjamo z zdravo kontrolo.

## Testiranje komplementnega sistema

**Indikacije:** sum na prirojeno okvaro komplementnega sistema, sum na izčrpanost komplementnega sistema zaradi preobsežne porabe ob okužbah in drugih vnetjih.

**Vzorec:** 3ml-epruveta krvi brez antikoagulantov (za serum) in 3ml-epruveta krvi z EDTA (za plazmo), ali urin z EDTA, vse transport na ledu.

### Testi:

#### Osnovno testiranje:

- Klasična pot - CH50 (vzorec serum)
- Alternativna pot - APH50 (vzorec serum)
- Lektinska pot (v uvajanju, vzorec serum)
- C3d/dg in C4d (vzorec serum ali plazma)

#### Nadaljevalno testiranje (v primeru odstopanj pri osnovnem testiranju, sicer testiranje ni smiselno):

- C3 (vzorec serum ali plazma)
- C4 (vzorec serum ali plazma)
- C1 inhibitor (vzorec serum ali plazma)
- C1 inhibitor-aktivnost (vzorec plazma)
- C1q (vzorec serum ali plazma)
- C2 (vzorec serum ali plazma)
- C5 (vzorec serum ali plazma)
- C6 (vzorec serum ali plazma)
- C7 (vzorec serum ali plazma)
- C8 (vzorec serum ali plazma)
- C9 (vzorec serum ali plazma)
- Faktorji B, H in I (vzorec serum ali plazma)
- Litični kompleks SC5b-9 (vzorec plazma ali urin z EDTA)
- MBL in C3nef (v uvajanju)

## Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

Komplementni sistem je skupek 34 beljakovin, ki jih najdemo v krvi in medceličnici. Posamezne sestavine so lahko istočasno aktivatorji ali substrati za delovanje drugih sestavin. Sistem se aktivira po kaskadnem principu. Sproženju sledi nadzorovana razgradnja naslednjih sestavin in na koncu nastane efektorski kompleks, ki uniči tarčo. Povečanje ali zmanjšanje količine komplementnega sistema je povezano z akutnim vnetjem, zmanjšanje pa s pomanjkanjem faktorjev zaradi ponavljajočih se in kroničnih okužb, sistemskega lupus eritematosusa, glomerulonefritisa in mnogih drugih vnetnih bolezni. Pomanjkljivosti v sintezi ali funkciji ene od sestavin se kažejo s povečano

izpostavljenostjo okužbam s piogenimi bakterijami, posebno *Neisseria meningitidis* (X, W in Z) in *Streptococcus pneumoniae*.

Pri racionalni diagnostiki aktiviranosti komplementnega sistema je potrebno najprej izmeriti dejavnost klasične poti, alternativne poti in razpadnih proizvodov molekule C3 (C3d). Merilo za povečano *in vivo* aktiviranost komplementnega sistema (npr. ob sepsi) je izmerjena zmanjšana laboratorijska aktivnost CH50 in/ali APH50. Ker je zmanjšana aktivnost lahko tudi znak prirojene okvare komplementnega sistema, je pomembna količina odlomkov C3dg in C3d, ki nastanejo ob razpadu C3. Če je količina C3dg in C3d povečana, gre za laboratorijsko zmanjšano aktiviranost zaradi prevelike porabe sestavin, ki je posledica velike aktiviranosti *in vivo*. Če je količina C3dg in C3d normalna, pa je zmanjšanje aktivnosti posledica genske okvare sinteze določene sestavine.

V primeru normalnih vrednosti CH50, APH50 in C3d/dg, nadaljnja diagnostika komplementnega sistema ni potrebna, ker deluje primerno, tako kvantitativno kot kvalitativno. Če gre za zmanjšano aktivnost CH50 in/ali APH50, pa vzrok določimo s testiranjem posameznih komponent komplementnega sistema.

V primeru, da ne nastajajo terminalni kompleksi (zmanjšan SC5b-9), je verjetno okvara v njihovem nastajanju. V tem primeru sta klasična pot aktivacije in alternativna pot aktivacije močno zmanjšani. Če sta C3dg in C3d ob tem v normalnem območju, je okvarjena ena od sestavin od C5 do C9. Če sta C3dg in C3d povečana, gre za izčrpanost sistema.

Okvare tvorbe litičnega kompleksa pogosto spremljajo okužbe z bakterijo *Neisseria meningitidis*. Neiserijska okužba in močno zmanjšanje aktiviranosti po klasični poti in alternativni poti z normalnim C3dg je zelo sumljivo za okvaro sestavin terminalne poti. Katera od sestavin je okvarjena ugotovimo tako, da izmerimo količino proteina posamezne sestavine. Če je proteina manj kot polovico pričakovane količine je velika verjetnost, da je sinteza okvarjena. Pri homozigotnih okvarah je navadno proteina izjemno malo ali pa nič, pri heterozigotnih pa ga je navadno okoli polovica normalne vrednosti.

#### **Osnovno testiranje:**

##### **- Klasična pot- CH50**

Preiskava je namenjena merjenju zmožnosti aktiviranja komplementnega sistema v človeškem serumu ali plazmi po klasični poti.

Test sodi med biološke teste za ugotavljanje aktiviranosti komplementnega sistema. Temelji na spoznanju, da imunski kompleksi aktivirajo komplement po klasični poti. To se zgodi tako, da se komponenta C1 (podenota C1q) veže s Fc delom imunoglobulinske molekule IgM ali IgG, ki je vezana na antigen. Aktivaciji C1 sledi aktivacija C4 in C2 in nastanek konvertaze C3 po klasični poti. Ta konvertaza razgradi molekulo C3, kar se kaže s povečano navzočnostjo odlomka C3d/dg in nastankom konvertaze C5 po klasični poti. Konvertaza C5 razgradi sestavino C5 na odlomka C5a in C5b. Z dodajanjem sestavin C6 do C9 k C5b se zgradi litični kompleks (C5b-9 ali MAC). Ker služijo v testu za imunske komplekse ovčji eritrociti na katere so vezana ovčja antieritrocitna protitelesa (hemolizin), je končna posledica aktivacije komplementa liza eritrocitov. Z merjenjem obsega hemolize izmerimo stopnjo aktiviranosti komplementnega sistema.

##### **- Alternativna pot- APH50**

Preiskava je namenjena merjenju zmožnosti aktiviranja komplementnega sistema v človeškem serumu ali plazmi po alternativni poti.

Ob stiku s tujimi površinami, npr. bakterijsko steno, se aktivira komplement po alternativni poti. To se zgodi tako, da se komponenta C3 ob stiku s tujo površino v navzočnosti vode razgradi v odlomka C3a in C3b. Odlomek C3b veže faktor B in nastane kompleks C3bB, ki je substrat za delovanje faktorja D. Faktor D razgradi vezani faktor B na odlomka Ba in Bb. Nastane nov kompleks, ki ga imenujemo konvertaza C3 po alternativni poti in ima zgradbo C3bBb. Konvertaza C3 po alternativni poti se stabilizira v navzočnosti faktorja P (properdin) in cepi molekulo C3 na C3a in C3b. Ker lahko konvertaza C3 po alternativni poti cepi več sto molekul C3, se tako proces močno ojači. Odlomek C3b se prilepi h kompleksu C3bBb in nastane nov kompleks C3bBbC3b, ki je konvertaza C5 po alternativni poti. Ta konvertaza cepi molekulo C5. Z dodajanjem sestavin C6 do C9 na C5b se zgradi litični kompleks (C5b-9 ali MAC). V testu služijo za tujo površino kunčji eritrociti, zato pride do aktivacije komplementa po alternativni poti in lize eritrocitov. Z merjenjem obsega hemolize izmerimo zmožnost aktivacije komplementnega sistema po alternativni poti.

#### - C3d/dg

Komponenta ali sestavina C3 je osrednja sestavina komplementnega sistema. Z njeno cepitvijo nastanejo proizvodi, ki omogočajo nastanek terminalnega kompleksa. C3 razpade na C3a in C3b. Odlomek C3a je šibek anafilatoksin in se hitro razgubi, odlomek C3b pa je pomemben za tvorbo konvertaze C3 po alternativni, konvertaze C5 po klasični in konvertaze C5 po alternativni poti. Odlomek C3b je aktiven samo v vezani obliki, prost pa razpade na C3c in na koncu na C3dg in C3d. Iz količine končnega produkta razpada molekule C3 lahko sklepamo na aktivnost komplementnega sistema po klasični, alternativni in lektinski poti. Več kot je razpadnega proizvoda C3d/dg, bolj je sistem aktiviran in večja je verjetnost, da je v organizmu vnetni proces. Posledica vnetnega procesa in obsežne aktivacije komplementnega sistema se lahko kažejo z laboratorijsko zmanjšano aktivnostjo sistema. Takšno zmanjšano aktivnost lahko dobimo tudi pri okvarjeni sintezi določenih sestavin komplementne kaskade – prirojeni defekti. V takšnih primerih ostaja količina C3d/dg normalna, saj se komplement ne aktivira prekomerno in zato ostaja razgradnja C3 normalna.

Metoda, ki jo uporabljamo za merjenje odlomka C3d/dg je raketna imunoelektroforeza. Preiskovani vzorec pošljemo v enosmernem električnem polju skozi agarški gel, ki vsebuje protitelesa proti odlomku C3c v agarški gel, ki vsebuje protitelesa proti odlomku C3d/dg. V coni ekvivalence nastane imunski precipitat, ki ga z barvanjem naredimo vidnega. Z merjenjem višine precipitacijskega repa rakete določimo koncentracijo C3d/dg v preiskovanem vzorcu. Količino C3d/dg izrazimo v enotah glade na umeritveni standard z znano koncentracijo C3d/dg.

### Nadaljevalno testiranje

#### - C3

Sestavina C3 je osrednja in najobilnejša sestavina komplementnega sistema. Konvertaza C3 po klasični in/ali konvertaza po alternativni poti cepita molekulo C3 v odlomka C3a in C3b. Odlomek C3b tvori skupaj s konvertazo C3 po klasični poti konvertazo C5 po klasični poti in s konvertazo C3 po alternativni poti konvertazo C5 po alternativni poti. Merjenje količine C3 je pomembno za spremljanje aktivnosti klasične, alternativne in lektinske poti aktivacije. Povečane količine C3 so povezane z akutnim vnetjem, zmanjšane pa s pomanjkanjem faktorja I, ponavljajočimi se in kroničnimi okužbami, sistemskim lupus eritematosusom, glomerulonefritisom in drugimi vnetnimi boleznimi.

#### - C4



Merjenje količine C4 je pomembno za spremljanje aktivnosti klasične in lektinske poti aktivacije. Povečane ali zmanjšane količine C4 so povezane z akutnim vnetjem, zmanjšane pa s pomanjkanjem faktorja I, ponavljajočimi se in kroničnimi okužbami, sistemskim lupus eritematozom, glomerulonefritisom in drugimi vnetnimi boleznimi.

#### - **C1 inhibitor**

C1 INH ali C1 INA (inaktivator) ali C1 esterazni inhibitor je regulatorna beljakovina, ki zavira delovanje večih serinskih proteaz, kot so: plazmin, kalikrein, faktor XIa in XIIIa. Tako je torej pomemben za učinkovito delovanje komplementnega sistema, sistema kalikrein-kinin, koagulacijske in fibrinolitične kaskade. C1 inhibitor se kovalentno veže na aktivirana C1s in C1r in onemogoči nadaljnji potek klasične poti aktivacije komplementnega sistema. Pomanjkanje C1 inhibitorja se kaže z nekontroliranim potekom klasične poti aktivacije komplementnega sistema. Klinično se defekt kaže s ponavljajočimi se napadi akutnega edema predvsem v predelu ustne votline, lahko pa tudi na okončinah in v predelu spolovil. Defekt je lahko prirojen ali pridobljen. Prirojeno obliko imenujemo tudi hereditarni angioedem (HAE) ali Quincke-jev edem. Zaradi povečane potrošnje sestavin klasične poti se sekundarno lahko pojavljajo znamenja bolezni imunskih kompleksov. Pridobljene oblike so povezane z benignimi in malignimi limfoproliferativnimi boleznimi, predvsem limfocitov B.

#### - **C1q**

C1q je heksamerni serumski protein gama 2 in je podenota kompleksa C1. S svojimi globularnimi deli se veže za regijo CH2 v imunski kompleks vezanih molekul IgG ali regijo CH3 molekule IgM, ki je vezana z antigenom. Z vezavo se spremeni konformacija molekule C1q, kar povzroči aktivacijo molekul C1r in C1s, s tem pa se prične klasična pot aktivacije komplementa. Količina C1q je zmanjšana pri boleznih imunskih kompleksov, sistemskem lupus eritematozusu in meningitisu. Zmanjšana je lahko tudi zaradi prirojene imunske pomanjkljivosti.

#### - **C2**

Sestavina C2 je ena od sestavin klasične poti aktivacije komplementnega sistema. Po aktivaciji molekule C1s nastane iz sestavine C2 odlomka C2a in C2b. Odlomek C2a skupaj z odlomkom C4b tvori konvertazo C3. Merjenje količine C2 je pomembno za spremljanje aktivnosti klasične in lektinske poti aktivacije. Povečane ali zmanjšane količine C2 so povezane z akutnim vnetjem, zmanjšane pa s pomanjkanjem faktorja I, ponavljajočimi se in kroničnimi okužbami, sistemskim lupus eritematozom, glomerulonefritisom in drugimi vnetnimi boleznimi.

#### - **C5**

Sestavina C5 je ena od sestavin klasične poti aktivacije komplementnega sistema. Konvertaza C5 cepi molekulo C5 v odlomka C5a in C5b. Odlomek C5b sodeluje pri nastanku terminalnega kompleksa, ki je odgovoren za poškodbe membran celic. Odlomek C5a je močan anafilatoksin in pomemben za kemotoksijo fagocitnih celic. Pomanjkanje C5 je povezano s ponavljajočimi se okužbami z bakterijama *Neisseria meningitidis* in *Neisseria gonorrhoeae*.

#### - **C6**

Sestavina C6 komplementnega sistema začne sestavljati terminalni kompleks (C5b-9) tako, da se veže na odlomek C5b. Če sestavine C6 ni, terminalni kompleks ne more nastati. Takrat so pogoste okužbe z bakterijama *Neisseria meningitidis* in *Neisseria gonorrhoeae*. Pomanjkanje vodi pogosto do vnetnih bolezni kot je sistemski lupus eritematosus.

## - C7

Sestavina C7 je ena od sestavin terminalne poti aktivacije komplementnega sistema. Po aktivaciji molekule C5 nastaneta odlomka C5a in C5b. Odlomek C5b začne skupaj s sestavino C6 tvorbo terminalnega kompleksa, ki se ji pridruži sestavina C7. Če sestavine C7 ni, terminalni kompleks ne more nastati. Takrat so pogoste okužbe z bakterijama *Neisseria meningitidis* in *Neisseria gonorrhoeae*. Pomanjkanje vodi pogosto do vnetnih bolezni kot je sistemski lupus eritematozus.

## - C8

Sestavina C8 je ena od sestavin klasične poti aktivacije komplementnega sistema. Po aktivaciji molekule C5 nastaneta odlomka C5a in C5b. Odlomek C5b začne skupaj s sestavino C6 tvorbo terminalnega kompleksa, ki se ji pridruži sestavini C7 in C8. Če sestavine C8 ni, terminalni kompleks ne more nastati. Takrat so pogoste okužbe z bakterijama *Neisseria meningitidis* in *Neisseria gonorrhoeae*. Pomanjkanje vodi pogosto do vnetnih bolezni kot je sistemski lupus eritematozus.

## - C9

Sestavina C9 je zadnja od sestavin klasične poti aktivacije komplementnega sistema. Po aktivaciji molekule C5 nastaneta odlomka C5a in C5b. Odlomek C5b začne skupaj s sestavino C6 tvorbo terminalnega kompleksa, ki se ji pridruži sestavini C7 in C8. Zadnja se priključi sestavina C9, ki polimerizira v obliki valja, ki tvori terminalni kompleks. Če sestavine C9 ni, ne nastane popoln terminalni kompleks. Takšne so razmere pri Japoncih, kakšne pa so konkretne posledice še ni raziskano. Vsekakor pomanjkanje ne vodi do očitnih bolezenskih sprememb.

## - Faktor B, H, I

Faktor B je sestavina alternativne poti aktivacije komplementnega sistema. Faktor B se veže z odlomkom C3b, ki nastane po spontani ali encimski hidrolizi faktorja C3 in tvori kompleks C3bB. C3bB je substrat za faktor H, ki cepi molekulo B v odlomka Ba in Bb. Odlomek Bb ostane vezan s C3b in skupaj tvorita konvertazo C3 po alternativni poti (C3bBb). Pomanjkanje faktorja B ni poznano.

Faktor H je pomembna regulacijska sestavina alternativne poti aktivacije komplementnega sistema. Veže se z odlomkom C3b in tako preprečuje nastanek konvertaze C3 po alternativni poti. Ker ima veliko afiniteto do odlomka C3b, ki je vezan za lastne celice in majhno afiniteto do C3b, ki je vezan na bakterijsko celico, prepreči vezavo faktorja B za C3b na lastnih celicah in tako prepreči poškodbo lastnih celic. Hkrati pa prepušča faktorju B C3b, ki je vezan na bakterijskih celicah, da izgradi kompleks C3bB in nastane konvertaza C3 po alternativni poti, kar ima za posledico nastanek litičnega kompleksa. Faktor H je istočasno kofaktor, ki omogoča faktorju I, da razgradi odlomek C3b v iC3b in končno v C3d in tako prepreči izgradnjo konvertaze C3 (C3bBb) po alternativni poti. Faktor H deluje tudi kot »decay accelerating faktor«, ki pospešuje razgradnjo C3bBb. Na oba načina preprečuje aktivacijo komplementnega sistema po alternativni poti. Genetska okvara faktorja H je povezana z nastankom s starostjo povezane degeneracije makule (AMD) in slepote ter atipičnim uremičnim sindromom (aHUS).

Faktor I je sestavina alternativne poti aktivacije komplementnega sistema. Faktor I zavira delovanje konvertaz C3 in C5 po klasični in alternativni poti. Pomanjkanje faktorja I vodi do povečane porabe faktorja C3 in B, nekaj manjša pa je tudi tvorba C5b-9. Posledica so lahko hude gnojne okužbe, včasih povezane tudi z bakterijama *Neisseria meningitidis* in *Neisseria gonorrhoeae* in boleznimi imunskih kompleksov.

## - Litični kompleks ali SC5b-9

Na koncu nastane efektorski kompleks, ki uniči tarčo. Efektorski kompleks imenujemo tudi terminalni kompleks ali litični kompleks ali s kratico SC5b-9. Povečanje količine SC5b-9 je povezano z vnetjem. Ugotavljanje SC5b-9 v urinu je merilo za poškodbo ledvične bazalne membrane in kazalec vloge komplementnega sistema pri nastanku ledvičnih obolenj.

Test sodi med encimsko imunske teste. Z lovilnimi monoklonskimi protitelesi, ki so vezana za dno mikrotitrne ploščice, odkrivamo na novo nastale antigenske determinante sestavine C9 v litičnem kompleksu. Navzoči SC5b-9 kompleksi se vežejo na lovilna protitelesa. Vezane SC5b-9 odkrijemo s sekundarnimi kunčjimi protitelesi uperjenimi proti sestavini C5. Vezavo sekundarnih protiteles potrdimo z vezavo terciarnih protikunčjih protiteles konjugiranih s hrenovo peroksidazo. Iz razgradnje 1,2 fenilen diamino dihidroklorida, ki je substrat za hrenovo peroksidazo, sklepamo na količino terminalnih kompleksov v preiskovanem vzorcu.

## **Testiranje prirojenih motenj v delovanju fagocitnih celic**

**Indikacije:** sum na prirojeno okvaro v delovanju fagocitnih celic (levkocitni adhezijski defekti - LAD 1, 2 in 3; kronična granulomatozna bolezen - CGD, kongenitalna nevtropenija, ciklična nevtropenija, sindrom Chediak Higashi.

Testi:

- Test fagocitoze *E. coli* (fagotest - pretočna citometrija)
- Test znotrajceličnega oksidativnega izbruha (bursttest - pretočna citometrija)
- Oksidativni izbruh - kemiluminiscenca
- Test LAD1 (ekspresija CD11b, CD11c in CD18 na monocitih - pretočna citometrija)
- Test LAD2 (ekspresija CD15s) na limfocitih in monocitih

### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

Fagociti (phago-gr. jesti, cyte-gr. celica) so del naravne odpornosti in so bistveni pri prepoznavanju in odstranjevanju patogenih mikroorganizmov ter pritegnitvi ostalih vnetnih celic na mesto okužbe. Med fagocitne celice uvrščamo monocite, makrofage in nevtrofilce. Naštete celice so za razliko od ostalih celic imunskega odziva sposobne požiranja in znotrajceličnega ubijanja.

Pri sumu na motnje fagocitoze je racionalno najprej testirati fagocitno funkcijo in oksidativni izbruh s pretočno citometrijo. V primeru nezadostne oksidativne funkcije se dela potrditev s kemoluminiscentnim testom; v primeru nezadostne fagocitne funkcije se dela nadaljnja diagnostika s testom LAD.

#### *Kongenitalne nevtropenije - Ciklična nevtropenija in Kostmannov sindrom*

Ciklična nevtropenija je bolezen, ki se deduje avtosomno dominantno, vendar se pojavlja tudi sporadično. Za bolezen je značilna na 21 dni ponavljajoča se nevtropenija, ki vztraja 3 do 6 dni. V tem času znaša absolutno število nevtrofilcev manj kot 200 celic na mm<sup>3</sup>. Molekularna in celična osnova bolezni je v okvari gena ELA2, ki nosi zapis za nevtrofilno elastazo, serinsko proteazo, ki se v večini sintetizira v promielocitu. Mutacija prizadene katalitično stran encima, ki postane neaktiven. Predvidevajo, da kopičenje nedelujočega encima pospeši apoptozo promielocitov.

Kostmannov sindrom je heterogena motnja, ki je sorodna ciklični nevtropeniji. Deduje se avtosomno recesivno in avtosomno dominantno, opisani so tudi sporadični primeri. Za bolezen je značilna huda nevtropenija z absolutnim številom nevtrofilcev 500 celic na mm<sup>3</sup>. Značilen je zastoj zorenja nevtrofilcev v promielocitni fazi in odsotnost zorenja mielocitov.

#### *Pomanjkljivost levkocitne adhezije (LAD, okr. Leucocyte adhesion deficiency syndrome)*

LAD tip 1 je avtosomno recesivna bolezen. Za bolezen je značilna nevtrofilija in ponavljajoče se diseminirane okužbe. Vzrok bolezni je mutacija gena ITGB2, ki kodira zapis za CD18, skupno  $\beta$  podenoto vseh  $\beta$ -integrinov (LFA-1, Mac-1, p150 in CD11d/CD1). Zaradi pomanjkanja ali odsotnosti integrinov je onemogočen transepitelijski prehod levkocitov, migracija na mesto okužbe in endocitoza. Pri hudi fenotipski obliki bolezni je na površini levkocitov izraženih manj kot 1 odstotek CD18, pri zmerni obliki se na površini nahaja od 1 do 30 odstotkov CD18. Opisana je tudi oblika LAD-1 z normalno ekspresijo nefunkcionalnih CD18. V klinični sliki zasledimo pozno celjenje popka z ali brez omfalitisa, pomembno levkocitozo, slabo celjenje ran, ponavljajoče se okužbe s piogenimi

bakterijami. V hudi fenotipski obliki so pogoste ponavljajoče pljučnice, meningitisi, mastoiditisi. Diagnostični test za odkrivanje LAD tip 1 je pretočna citometrija, s katero ugotavljamo prisotnost CD18 na površini nestimuliranih in s PMA (phorbol myristat acetate) stimuliranih levkocitih.

LAD tip 2 je avtosomno recesivno podedovana bolezen z motnjo v sintezi fukoze iz GDP manoze. Posledične se ne tvori sialyl-Lewis x protein (fukoziliran lizinski protein) na levkocitih, ki je ligand za epitelijske selektine v prvi stopnji levkocitne diapedeze. Encimski defekti in kromosomsko mesto okvare še niso poznani. Poleg ogrožajočih okužb so pri bolnikih izražene značilne fenotipske poteze obraza, zaostajanje v rasti in mentalna prizadetost. Diagnostični test za odkrivanje LAD tip 2 je pretočna citometrija s katero ugotavljamo prisotnost sialyl-Lewis x proteina (CD15s) na površini levkocitov.

#### *Pomanjkanje specifičnih lizosomov (SGD, specific granule deficiency)*

Je redka motnja nevtrofilcev. Najverjetneje gre za okvaro gena za C/EBP epsilon transkripcijski faktor, ki ima tako inhibitorno kot aktivacijsko vlogo. Pri bolnikih so pogoste povrhnje in globoke okužbe kože, abscesi, respiratorne okužbe, pljučnice, otitisi in mastoiditisi. Diagnozo postavimo z mikroskopskim pregledom nevtrofilcev z značilnim jedrom. Patološki so tudi testi adhezije in baktericidne sposobnosti nevtrofilcev, ki pa niso specifični.

#### *Kronična granulomatozna bolezen*

Pojavnost kronične granulomatozne bolezni je 1:100 000 do 1:200 000 ljudi. Vzrok bolezni so mutacije genov vsaj štirih podenot NADPH oksidaznega kompleksa fagocita. Najbolj pogosta je X-vezana mutacija gena  $\alpha$ -podenote citokroma b558 (phox-91). Mutacije ostalih podenot NADPH-oksidade se deduje avtosomno recesivno. Nefunkcionalna NADPH oksidaza ni sposobna redukcije molekularnega kisika neposredno v superoksidni anion, ki je predstopnja vodikovega peroksida in halidnih spojin, kar pomeni nezmožnost ubijanja fagocitiranega delca. Za bolezen so značilne hude ponavljajoče okužbe epiteljskih površin, ki so v direktnem stiku z okoljem (koža, pljuča, črevo) s katalaza-pozitivnimi bakterijami (*S. aureus*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Aerobacter in Serratia*) in glivami (*Aspergillus sp.*, *Candida sp.*). Poleg tega so dokazali, da nevtrofilci bolnikov niso sposobni izpostaviti na svoji površini fosfatidilserina, ki je signalna molekula za apoptozo celice. Nezmožnost apoptoze fagocitnih celic povzroči obsežne nekroze, degranulacijo toksične vsebine in aktivacijo kroničnega vnetnega odziva, kar vodi do nastanka granulomov. V klinični sliki pogosto najdemo limfadenitis, kožne abscese, pljučnice, hepatomegalijo in črevesne simptome podobne kot pri Crohnovi bolezni.<sup>11</sup>

#### *Okvara mieloperoksidaze*

Kongenitalna okvara mieloperoksidaze se pojavlja na 1:4000 ljudi in je v večini primerov klinično nema. Največkrat gre za mutacijo MPO gena, ki vodi v neuspešno vgraditev hema v zrelo molekulo. Nevtrofilec je sposoben normalno tvoriti vodikov peroksid, okvarjena pa je produkcija hipohalidov in drugih toksičnih halidnih spojin. Bolniki z okvaro funkcije nevtrofilcev imajo bolj pogoste glivične okužbe s *Candida sp.*

#### *Motnja v osi interferon- $\gamma$ -interlevkin-12*

Os interferon- $\gamma$ -interlevkin-12 je bistvena pri obrambi pred znotrajceličnimi mikrobi kot so mikobakterije, salmonele in listerije. Fenotipsko se bolezen najhuje izrazi pri popolnem pomanjkanju INF- $\gamma$ R1 receptorjev. Okvara se deduje avtosomno dominantno in avtosomno recesivno. Bolniki ne morejo tvoriti granulomov pri mikobakterijskih okužbah. Bolezen se izrazi s hudo razširjeno okužbo z atipičnimi mikobakterijami (*M. avium*, *M. bovis*, *M. fortuitum*).

## Test fagocitoze *E. coli* (fagotest) in test znotrajceličnega oksidativnega izbruha (bursttest) - pretočna citometrija

**Vzorec:** Venska kri odvzeta v epruveto s heparinom. Citrirana kri ali kri odvzeta v epruveto z EDTA nista primerni za preiskavo!

Fagotest je namenjen merjenju fagocitne zmožnosti nevtrofilcev in monocitov. S spreminjanjem izbora populacije krvnih celic lahko test izvedemo posebej za nevtrofilne granulocite in monocite.

Bursttest je namenjen merjenju obsega znotrajceličnega ubijanja s proizvodnjo kisikovih radikalov. Oksidativna eksplozija (burst) je pomemben vidik naravne odpornosti. Izvajajo jo fagocitne celice. V krvi so to nevtrofilci in monociti. Fagociti prepoznavajo tujke s posebnimi receptorji in se preko njih aktivirajo. Posledica je formacija fagosoma in na koncu fagolizosoma. Znotraj fagolizosoma pride do ubijanja antigena in njegove razgradnje. Obseg oksidativne eksplozije izmerimo tako, da fagocitom ponudimo opsonizirane celice bakterije *E. coli*, označene s FITC. Fagociti bakterije fagocitirajo in znotrajcelično ubijejo s tvorbo kisikovih radikalov. Proces poteka v okolju, ki vsebuje 123 dihidrorodamin (DHR). Nastali kisikovi radikali oksidirajo 123 dihidrorodamin v 123 rodamin. S preiskavo tako ugotavljamo delež nevtrofilcev oz. monocitov, ki so fagocitirali bakterije. Obenem ugotavljamo tudi delež celic, ki imajo zmožnost ubijanja s kisikovimi radikali. To so celice, ki so oksidirale dihidrorodamin, iz intenzitete fluorescence in odstotka fagocitiranih celic ocenimo obseg oksidativnega izbruha.

### Oksidativni izbruh - kemiluminiscenca

**Vzorec:** 1 ml sveže heparinizirane krvi

*In vitro* določanje aktivnosti NADPH-oksidade in oksidativnega izbruha v fagocitih s kemiluminiscenco (KL) z luminolom.

**NADPH-oksida** – fagociti imajo večmolekularni encimski sistem, NADPH-oksidozo, ki katalizira enoelektronsko redukcijo kisika v superoksidni anion; izdelovanju superoksidnega aniona sledi oksidativni izbruh, to je izdelovanje citotoksičnih reaktivnih kisikovih vrst (ROS), ki imajo osrednjo vlogo pri znotrajceličnem uničenju zajetih mikrobov v fagolizosomu.

Fagocite v heparinizirani krvi izpostavimo forbol-miristat-acetatu (PMA), aktivatorju protein kinaze C, ki aktivirana spodbudi NADPH-oksidozo. ROS reagirajo z dodanim luminolom in sprožijo emisijo vidne svetlobe (približno 425 nm, kemiluminiscenca). KL je sorazmerna z aktivnostjo NADPH-oksidade in jo merimo z luminometrom v mV na časovno enoto.

Če dobimo v laboratorij kri bolnika v obdobju nevtropenije (zmanjšano število polimorfonuklearnih granulocitov-nevtrofilcev), izostanek KL še ne pomeni funkcijske okvare NADPH-oksidade. Vzrok za zmanjšano KL je lahko samo zmanjšano število nevtrofilcev.

## Testiranje pokazateljev vnetja (nespecifičnega, septičnega, alergijskega)

**Indikacije:** spremljanje akutnega vnetja (CRP), zgodnja detekcija septičnega vnetja (Sepsa CD64 test), detekcija alergijskega vnetja (ECP, triptaza).

### Koncentracija CRP v serumu

Testi:

- CRP

**Vzorec:** 3ml epruveta – kri (EDTA) ali 3 ml epruveta – serum (samo za CRP)

### Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

Reakcija akutne faze vnetja je obrambni odziv, ki omeji področje okvare in aktivira imunski sistem. Sprožitelji akutne faze vnetja so okužbe, poškodbe (mehanske, toksične, termične), maligni, avtoimunski, preobčutljivostni procesi. Vsi sprožijo na mestu delovanja lokalno reakcijo, katere patomorfološki substrat je vnetni infiltrat. V njem se iz aktiviranih celic (makrofagov, fibroblastov, endotelijskih celic) sproščajo različni citokini, ki so odgovorni za generalizirane znake in simptome vnetnega dogajanja. Ti so povišana telesna temperatura, inapetenca, mišična bolečina in katabolizem mišičnih proteinov, levkocitoza in produkcija proteinov akutne faze vnetja (PAF). Citokini IL1 $\beta$ , TNFalfa in IL6 so močni induktorji sinteze PAF, ki poteka v jetrih, medtem ko imajo drugi citokini modulirajoči učinek na njihovo sintezo. Sinteza določenih proteinov v jetrih se tako v akutni fazi vnetja poveča, te proteine imenujemo pozitivni PAF, ti so C-reaktivni protein, serumski amiloid A, fibrinogen, alfa1 antitripsin, alfa2 makroglobulin, alfa1 kisli glikoprotein, prokalcitonin, haptoglobin in komponente komplemента. Proteini, katerih sinteza v jetrih in koncentracija v plazmi se zmanjša imenujemo negativni PAF ( prealbumin, albumin, transferin, alfa1 lipoprotein)

C-reaktivni protein (CRP) je v klinični praksi najpomembnejši protein akutne faze vnetja. Ime je dobil zaradi svoje lastnosti, da reagira s polisaharidom C pnevmokoka. Njegova normalna koncentracija v krvi je do 6 mg/l. Koncentracija se poviša že nekaj ur po začetku vnetja, tudi do 1000 $\times$ . Zaradi kratke razpolovne dobe, ki je 4 ure, po odstranitvi stimulusa njegova koncentracija tudi hitro upade, kar mu daje lastnosti dobrega markerja vnetja. V organizmu povzroči aktivacijo komplemента po klasični poti, pospeši fagocitozo in zavira agregacijo trombocitov. Fiziološko povišane koncentracije ugotavljamo v nosečnosti, po porodu in po ekstremnem fizičnem naporu. Zmerno povišane vrednosti spremljajo akutni miokardni infarkt, maligna in vezivno tkivna obolenja. Zelo visoke vrednosti govorijo za invazivno bakterijsko infekcijo.

Preiskava temelji na reakciji aglutinacije lateksa, ki jo ovrednotimo z nefelometrično metodo. Delci iz polistirena, na katere so vezana monoklonska protitelesa proti CRP, aglutinirajo, če jih pomešamo z bolnikovim vzorcem, ki vsebuje CRP. Ob prehodu svetlobnega žarka skozi suspenzijo aglutinativ lateksa nato pride do sipanja svetlobe. Intenziteta sipane svetlobe v suspenziji je sorazmerna koncentraciji CRP v vzorcu. Koncentracijo CRP v vzorcu dobimo s primerjavo intenzitet sipane svetlobe v suspenziji bolnikovega vzorca in standardnega vzorca z znano koncentracijo CRP.

## Zgodnja detekcija septičnega vnetja

Testi

- Sepsa CD64 test

**Vzorec:** 2-3 ml (minimalno 0,5 ml) venske krvi, odvzete v epruveto za vakuumski odzem z antikoagulantom (EDTA ali heparin).

### Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

**CD64** je membranski glikoprotein, ki se konstitutivno izraža samo na makrofagih in monocitih. Citokini (mediatorji vnetja), kot sta IFN $\gamma$  in G-CSF, povečajo izražanje CD64 na polimorfonuklearnih levkocitih.

Preiskava je namenjena merjenju Fc $\gamma$ R1 receptorja (CD64) na nevtrofilcih. Izražanje CD64 na membrani nevtrofilcev se močno poveča pri okužbah ali sindromu sistemskega vnetnega odgovora (SIRS). Nevtrofilci so poglavitne celice, ki sodelujejo pri akutni okužbi, zato je aktivacija le-teh dober pokazatelj sistemskega vnetja. Povečano izražanje CD64 molekul na nevtrofilcih je lahko dober diagnostični pokazatelj začetka infekcije/sepse. CD64 se skoraj ne izraža na nevtrofilcih zdravega človeka (manj kot 1000 molekul na celico), izražanje pa se poveča že 4 do 6 ur po okužbi, poleg tega pa je izražanje CD64 stabilno še 48 ur po odvzetju krvi.

### Zaznavanje alergijskega vnetja

Testi:

- Triptaza (aktivacija mastocitov)

- ECP (eozinofilni kationski protein) (aktivacija eozinofilcev)

### Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

Najpogostejše alergijske bolezni so posredovane z IgE, kar pomeni, da pri alergijski reakciji sodelujejo aktivirani mastociti in in bazofilci ter njihovi izločki. Ti sprožijo alergijsko vnetje in ga z aktivacijo drugih vnetnih celic, predvsem eozinofilcev in izločanjem novih mediatorjev še ojačajo in vzdržujejo. Na prvem mestu med mediatorji je histamin, biogeni amin, ki se takoj po aktivaciji izloči iz znotrajceličnih zalog (sekretorne granule) mastocitov in bazofilcev. Skupaj z njim se izloči tudi triptaza, ki pa jo najdemo samo v mastocitih. To je endogena peptidaza, specifična za lizin in arginin in je primeren označevalec aktivacije mastocitov. Za razliko od histamina, ki ga histaminaze hitro inaktivirajo, ostane triptaza dalj časa nedotaknjena, kar olajša njeno merjenje v telesnih tekočinah. V krvi je povečana med anafilaktično reakcijo, po 24 urah pa se zniža na izhodno vrednost. Triptaza je povečana tudi pri mastocitozah.

Eozinofilci sodelujejo pri alergijskem vnetju, posebno v kasni fazi odziva. Aktivirani izločajo bazične proteine, med katerimi je najbolj poznan kationski protein eozinofilcev (ECP). ECP merimo kot kazalec za aktivacijo eozinofilcev.



## Določevanje citokinov

### Določevanje koncentracije citokinov in topnih citokinskih receptorjev z metodo ELISA

**Indikacije:** spremljanje akutnega vnetja, kroničnega vnetja in protivnetnega odziva, zgodnja detekcija septičnega vnetja, spremljanje imunsko pogojenih bolezni, spremljanje aktivacije celic specifičnega imunskega odziva

**Vzorec:** Citokine in topne receptorje lahko merimo v telesnih tekočinah kot so plazma, serum, punktati, urin ali v celičnih supernatantih, vendar moramo upoštevati omejitve, ki jih postavlja proizvajalec v posameznih navodilih. Po navedbah proizvajalca IL-1 $\beta$  ne moremo meriti v plazmah z EDTA, po naših izkušnjah pa IL-8 ne moremo meriti v serumu. Pri vseh ostalih merjenjih sta najpogostejši vzorec plazma z EDTA in serum ter supernatanti. Kri in celične kulture centrifugiramo, da pridobimo serum, plazmo oz. supernatant brez celic. Zamrznjena kri ali celična kultura pred centrifugiranjem je neuporaben vzorec.

Količina: 1 do 7 ml krvi, 0,5 do 3 ml plazme oz. seruma (odvisno od števila merjenih citokinov)

### Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

Pri meritvah uporabljamo testne komplete ELISA različnih proizvajalcev. Postopke izvajamo po priloženih navodilih proizvajalca. Merjenje poteka v serijah. V vsaki seriji mora biti vključena umeritvena krivulja in interna kontrola.

#### Testi:

##### Citokini – vnetni

-TNF $\alpha$

-IL-1 $\beta$ \*

-IL-6

-IL-8

-IL-12

-IFN- $\gamma$

\*Merimo v serumu ali v plazmi z Na-citratom

##### Citokini – protivnetni

-IL-10

##### Citokini specifičnega imunskega odziva

-IL-2\* (aktivacijski)

-t-IL-2R (topni IL-2 receptor) (aktivacijski)

-IFN-  $\gamma$  (Th1)

-IL-4\* (Th2)

-IL-5 (Th2)

-IL-10 (regulatorni)

-TGF  $\beta$  1 (regulatorni)

\*Merimo v supernatantu celičnih kultur

**Hitro (urgentno) določevanje koncentracije vnetnih citokinov v krvi z metodo CBA (rezultat v 24 urah)**

**Indikacije:** spremljanje akutnega vnetja, zgodnja detekcija septičnega vnetja, spremljanje imunsko pogojenih bolezni

**Vzorec:** 3 ml epruveta – serum

Testi:

-Nabor citokinov: IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF, IFN-  $\gamma$

## Testiranje avtoprotiteles v serumu

### Revmatološko pomembna protitelesa in markerji

**Indikacije:** sum na revmatoidni artritis, spremljanje revmatoidnega artritisa, akutna streptokokna okužba z eksantemom, zapleti po streptokokni okužbi žrela (revmatska vročica, glomerulonefritis, miokarditis, endokarditis).

#### Testi:

- RF lateks
- RF Waaler Rose
- RF-razredi
- RF IgM
- RF IgG
- RF IgA
- CRP
- ASDB
- ASTAL
- AST

### Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

Revmatoidni artritis je avtoimunska bolezen, ki se navadno začne s spremembami na sklepih, prizadeti so predvsem mali sklepi. Pri bolnikih najdemo protitelesa, ki se vežejo specifično z delom Fc imunoglobulinov IgG. Takšnim protitelesom pravimo tudi revmatoidni faktor (RF). Sprva smo menili, da je pomemben samo revmatoidni faktor, ki so ga predstavljala protitelesa iz imunoglobulinskega razreda IgM, zdaj pa vemo, da so pomembni revmatoidni faktorji tudi iz imunoglobulinskih razredov IgG in IgA.

#### Določanje RF z aglutinacijo lateksa

**Vzorec:** svež človeški serum, plazma s heparinom ali plazma z EDTA.

Določanje revmatoidnega faktorja (lateks RF) temelji na reakciji aglutinacije lateksa, ki jo ovrednotimo z nefelometrično metodo. Delci iz polistirena, na katere so vezani kompleksi človeških  $\gamma$ -globulinov z ovčjimi protitelesi proti človeškim  $\gamma$ -globulinom, aglutinirajo, če jih pomešamo s serumskim vzorcem, ki vsebuje revmatoidni faktor. Ob prehodu svetlobnega žarka skozi suspenzijo aglutinativ lateksa nato pride do sipanja svetlobe. Intenziteta sipane svetlobe v suspenziji je sorazmerna koncentraciji revmatoidnega faktorja v vzorcu. Koncentracijo RF v vzorcu dobimo s primerjavo intenzitet sipane svetlobe v suspenziji bolnikovega vzorca in standardnega vzorca z znano koncentracijo RF. Metoda ni primerna za določanje revmatoidnega faktorja v motnih vzorcih in vzorcih, ki vsebujejo kakršnekoli delce.

#### Določanje RF s preskusom Waaler Rose

**Vzorec:** svež človeški serum ali sinovijska tekočina.

Preiskava na RF (preskus Waaler Rose) temelji na posredni aglutinacijski reakciji v mikrotitrni ploščici. Pri testu uporabljamo stabilizirane ovčje eritrocite, na katere so vezani kunčji  $\gamma$ -globulini proti ovčjim eritrocitom (senzibilizirani eritrociti). V navzočnosti RF pride do aglutinacije eritrocitov, v nasprotnem primeru, ko RF-a ni v vzorcu, pa se eritrociti zberejo na dno vdolbinice v eritrocitni gumb. Titer seruma je obratna vrednost zadnje razredčine seruma, pri kateri še opazimo aglutinacijo eritrocitov.

Čeprav je RF navzoč v približno 75% bolnikov z RA, je njegova specifičnost omejena. Najdemo ga tudi pri bolnikih z drugimi avtoimunskimi boleznimi (Sjogrenov sindrom, sistemski eritematozni lupus, mešana sistemska bolezen veziva itd.), nalezljivimi boleznimi (okužbe z mikobakterijami, spirohetami, brucelami, salmonelami, okužbe s paraziti, tripanosoma, plazmodium, šistosoma, trehinela, virusne okužbe z EBV, CMV, HIV, virusom hepatitisa B, virusom influence, virusom rubele) ter pri 3-5 % zdravih ljudi in celo pri 10-25 % zdravih starostnikov. Kljub temu je RF diagnostično koristen za bolnike z RA in ga določamo v serumu in sinovijski tekočini teh bolnikov.

#### Določanje RF z metodo ELISA

**Vzorec:** svež človeški serum.

**Revmatoidni faktorji IgM, IgG in IgA (RF IgM, RF IgG, RF IgA)** – RF IgM so najpogostejša avtoprotitelesa v serumu bolnikov z revmatoidnim artritismom in jih najpogosteje določamo z aglutinacijskimi testi. Z ELISA pa lahko poleg RF IgM dokažemo tudi RF IgG in RF IgA. Vsak razred RF se v bolnikovem serumu lahko pojavi tudi sam, neodvisno od drugih dveh razredov RF.

Gre za encimskoimunski test, kjer revmatoidne faktorje zasledimo z barvno reakcijo encima in substrata. Na vdolbinice mikroplošče je adsorbiran antigen: za določanje RF IgM in RF IgA je antigen človeški IgG, za določanje RF IgG je antigen kunčji IgG. Iz razredčenega bolnikovega seruma se z antigenom, med inkubacijo pri sobni temperaturi, veže revmatoidni faktor. Po spiranju mikroplošče dodamo encimski konjugat s peroksidazo: za določanje RF IgM je peroksidaza konjugirana z mišjimi protitelesi proti človeškim protitelesom IgM, za določanje RF IgG je peroksidaza konjugirana z mišjimi monoklonskimi protitelesi proti človeškim protitelesom IgG in za določanje RF IgA je peroksidaza konjugirana z mišjimi monoklonskimi protitelesi proti človeškim protitelesom IgA. Protitelesa v konjugatu se med inkubacijo pri sobni temperaturi vežejo z revmatoidnim faktorjem. Po spiranju mikroplošče dodamo substrat, ki med reakcijo s peroksidazo tvori modro obarvane produkte. Nakisanje z žvepleno kislino modro raztopino produktov spremeni v rumeno. Intenziteta rumene raztopine je sorazmerna koncentraciji revmatoidnega faktorja v vzorcu. Koncentracijo RF v serumskem vzorcu dobimo s primerjavo izmerjenih absorbanc, serumskega in standardnega vzorca z znano koncentracijo RF. Metoda ni primerna za določanje zelo visoke koncentracije RF, ki je izven merilnega območja metode, ker lahko tam pričakujemo Hookov učinek.

Negativni rezultat testa na RF ne sme biti kriterij za izločitev revmatoidnega artritisa. Prav tako pozitiven rezultat testa ne zadostuje za klinično diagnozo. Za to je potrebno obravnavati skupaj, klinična opažanja in rezultate vseh laboratorijskih testov.

#### Določanje protiteles proti streptokokni DNazi B (ASDB)

Streptokokna DNaza B je eksoencim desoksiribonukleaza B, ki ga izdelujejo streptokoki. Ugotavljanje prisotnosti protiteles proti streptokokni DNazi B uporabljamo v diagnostiki streptokoknih okužb in poznih zapletov teh okužb, kot sta revmatična vročica in poststreptokokni akutni glomerulonefritis. Protitelesa proti streptokokni DNazi B se pojavijo v krvi bolnikov s streptokokno okužbo kasneje kot

protitelesa proti streptolizinu O, vendar jih lahko določimo pri večjem številu bolnikov kot protitelesa proti streptolizinu O.

#### Določanje protiteles proti stafilokoknemu hemolizinu alfa z aglutinacijo lateksa (AStal)

**Vzorec:** svež človeški serum, plazma s heparinom ali plazma z EDTA.

Preiskava na protitelesa proti stafilokoknemu hemolizinu alfa z aglutinacijo lateksa je namenjena za *in vitro* kvalitativno ali polkvantitativno določanje protiteles proti stafilolizinu- $\alpha$  (AStal) v človeškem serumu.

Serum bolnika in lateks nanese na ploščico in premešamo. Ko se delci polistirena, prekrite s stafilokoknim hemolizinom alfa, pomešajo s serumom, ki vsebuje protitelesa proti stafilokoknemu hemolizinu alfa, tvorijo aglutinate.

#### Določanje protiteles proti streptolizinu O (AST)

**Vzorec:** svež človeški serum, plazma s heparinom ali plazma z EDTA.

Preiskava na protitelesa proti streptolizinu O (AST) temelji na reakciji aglutinacije lateksa.

Streptolizin O je toksin, ki ga izdelujejo sevi beta-hemolitičnih streptokokov skupine A, C in G. Povzroča razpad eritrocitov in je citotoksičen za nevtrofilce, trombocite in miokard. Streptolizin O je imunogen in sproži izdelovanje protiteles. Ugotavljanje prisotnosti protiteles proti streptolizinu O uporabljamo v diagnostiki streptokoknih okužb in poznih zapletov teh okužb, kot sta revmatična vročica in poststreptokokni akutni glomerulonefritis.

#### **Paraneoplastična protitelesa**

So humana avtoprotitelesa proti nevronskim antigenom Hu, Yo, Ri, CV2 (CRMP5), amfifizinu, Ma1 in Ma2. Njihova identifikacija je pomembna pri potrjevanju klinične diagnoze paraneoplastičnega sindroma ter pri ugotavljanju določenih vrst raka.

**Indikacije:** Paraneoplastični sindromi: cerebelarna degeneracija, mioklonus, Stiff-person sindrom, neopredeljena retinopatija, mielopatija, bolezen motoričnega nevrona, senzorična nevropatija, miastenski sindrom, polimiozitis-dermatomiozitis

**Vzorec:** 3 ml epruveta – serum ali likvor

#### Testi:

**-Anti-Hu (ANNA-1)**

(mikrocelični ca.)

**-Anti-Yo (PCA-1)**

(ca. dojk, ginekološki ca.)

**-Anti-Ri (ANNA-2)**

(ca. dojk, jajčnikov, mikrocelični ca.)

**-Anti-CV2 (CRMP5)**

(mikrocelični ca., timom)

**-Anti-amfifizin**

(ca. dojk, mikrocelični ca.)

**-Anti-Ma1**

(ca. maternice, jajčnikov, dojk, debelega črevesa)

**-Anti-Ma2 (Ta)**

(ca. testisov)

**Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

Patogeneza nastanka paraneoplastičnih sindromov: ektopična ekspresija antigenov živčnih celic s strani nekaterih tumorjev in pojav ustreznih avtoprotiteles, ki se vežejo na živčevje in prek aktivacija kompleksa povzročajo poškodbe živčnih celic.

Diagnostični pomen detekcije paraneoplastičnih protiteles:

1. Ugotovitev, ali je nevrološki sindrom del neoplastične bolezni;
2. Najdena protitelesa so orientacija za iskanje določenih vrst tumorjev;
3. pri znanem tumorju je detekcija netipičnih paraneoplastičnih protiteles napotilo za iskanje sekundarnega tumorja.

**Antigangliozidna protitelesa**

**Gangliozidi** so skupina glikosfingolipidov, ki se nahajajo v membranah celic živčnega sistema. Avtoprotitelesa proti gangliozidom povzročajo motorične in senzorične nevropatije. Protitelesa razreda IgM in IgG proti gangliozidom asialo-GM1, GM1, GM2, GD1a in GD1b so pogosto prisotna v serumu bolnikov z amiotrofično lateralno sklerozo (ALS) in Guillain-Barréjevim sindromom. Protitelesa proti GQ1b pa pri bolnikih z Miller-Fisherjevim sindromom.

**Indikacije:** Motorične in senzorične polinevropatije, multifokalna motorična nevropatija z bloki prevajanja, amiotrofična lateralna skleroza (ALS), Guillain-Barréjev sindrom (GBS), Miller-Fisherjev sindrom (MFS) in druge oblike akutnega poliradikulonevritisa

**Vzorec:** 3 ml epruveta – serum

Testi:

**-Anti-GM1** (IgG in/ali IgM)

(multifokalna motorična nevropatija z bloki prevajanja, amiotrofična lateralna skleroza (ALS), Guillain-Barréjev sindrom (GBS))

**-Anti-asialo-GM1** (IgG in/ali IgM)

(ALS, GBS)

**-Anti-GM2** (IgG in/ali IgM)

(GBS)

**-Anti-GD1a** (IgG in/ali IgM)

(Motorične in senzomotorične nevropatije, ALS, GBS)

**-Anti-GD1b** (IgG in/ali IgM)

(Motorične in senzomotorične nevropatije, ALS, GBS)

**-Anti-GQ1b** (IgG in/ali IgM)

(Motorične in senzomotorične nevropatije, Miller-Fisherjev sindrom (MFS), GBS oftalamoplegija)

**Protitelesa anti-MAG** (protitelesa proti z mielinom vezanimi glikoproteini)

**MAG** ali z mielinom povezani glikoprotein je sestavni del mielina v perifernem in centralnem živčnem sistemu. Protitelesa proti MAG so razreda IgM in povzročajo senzomotorične in demielinacijske periferne nevropatije. Prisotna so tudi v serumu bolnikov z multiplo sklerozo (MS).

**Indikacije:** Senzomotorične aksonske ali demielinacijske polinevropatije, posebej v povezavi s paraproteinemijami, multipla skleroza (MS)

**Vzorec:** 3 ml epruveta – serum

Testi:

-anti-MAG

**Testiranje navzočnosti nevtralizacijskih protiteles proti terapevtikom**

Presejalni luciferazni test uporabljamo za določanje odsotnosti oziroma možne prisotnosti nevtralizirajočih protiteles (NAb) proti interferonu- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) v serumih bolnikov z multiplo sklerozo, ki so na terapiji z IFN- $\beta$ .

**IFN- $\beta$**  je učinkovito zdravilo, ki zavira napredovanje multiple skleroze. Nastopa v dveh oblikah, in sicer kot IFN- $\beta$ -1b (Betaferon) in IFN- $\beta$ -1a (Avonex in Rebif).

**NAb proti IFN- $\beta$**  se vežejo na molekule IFN- $\beta$  in zmanjšajo njegovo biorazpoložljivost za ustrezne receptorje. S tem zavrejo oziroma nevtralizirajo terapevtski (imunoregulatorni) učinek IFN- $\beta$ . NAb se pojavijo pri 2-45% bolnikov, odvisno od vrste terapije. Običajno se pojavijo po 6-18 mesecih od začetka terapije.

Potrditveni test PCR v realnem času uporabljamo za določanje titra nevtralizirajočih protiteles (NAb) proti interferonu- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) v serumih bolnikov z multiplo sklerozo, ki so na terapiji z IFN- $\beta$ . Titer NAb določamo v vzorcih, pri katerih je bil % inhibicije pri presejalnem luciferaznem testu večji od 50

**Detekcija nastanka HACA HAMA, HAHA nevtralizacijskih protiteles (po dogovoru)**

**Indikacije:** Terapija z monoklonskimi mišjimi protitelesi – spremljanje učinkovitosti

**Vzorec:** 3 ml epruveta – serum

Testi:

-HAMA

-HACA

-HAHA



## Alergenski testi - Specifični IgE in IgG proti različnim alergenom

S to preiskavo merimo količino IgE ali IgG, specifičnih za posamezni alergen (slgE, slgG) v humanem serumu, humani plazmi ali v ostalih bioloških materialih humanega izvora. Preiskava je namenjena laboratorijski diagnostiki z IgE posredovanih alergijskih bolezni in laboratorijsko diagnostiko alergijskega alveolitisa ter za sledenje specifične imunoterapije s strupi kožekrilcev z merjenjem količine IgG.

Alergen je antigen ali haptent, ki aktivira imunski sistem tako, da izzove alergijsko reakcijo. ImmunoCAP je nosilec alergena z okroglim plastičnim okvirčkom, v katerem je derivat celuloze gobaste strukture, ki nudi veliko površino za kovalentno vezavo alergena.

Princip: metoda je fluoro encimskoimunski test. Alergen, ki ga vključimo v test, je kovalentno vezan na ImmunoCAP in reagira s slgE ali slgG v vzorcu. Po spiranju nevezanih sestavin sledi stopnja dodajanja anti-IgE/anti-IgG protiteles z vezanim encimom, ki tvorijo kompleks z IgE/IgG, vezanim na alergen. Po spiranju nevezanih anti-IgE/anti-IgG sledi inkubacija z razvijalcem, temu sledi faza ustavljanja reakcije, zadnje spiranje ImmunoCAP-a in merjenje fluorescence v izpirku. Več fluorescence pomeni več slgE/slgG v vzorcu. Za vrednotenje rezultata meritve v vzorcu uporabljamo umeritveno krivuljo.

Omejitve metode: Specifičnih IgE/IgG ne moremo meriti v celotni krvi, pripraviti moramo serum oz. plazmo iz sveže krvi. Predhodno zamrznjena kri ni primeren vzorec. Druge telesne tekočine ne smejo vsebovati delcev (centrifugiranje, odpipetiranje čiste tekočine, sluz v vzorcu moti). Omejitev je tudi premajhna količina vzorca. Najmanjši volumen vzorca, ki ga aparat zazna, je 140 mikrolitrov. Test za vsak nadaljnji alergen zahteva dodatnih 40 mikrolitrov vzorca.

### Specifični IgE proti sezonskim inhalacijskim alergenom - pelodu

**Indikacije:** Sezonski alergijski rinitis (seneni nahod)

**Vzorec:** 3 – 5 ml venske krvi brez antikoagulantov (serumski odvzem) ali 1,5 do 3 ml seruma

### Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

Sezonski alergijski rinitis (seneni nahod) se pojavlja, ko je v zraku veliko cvetnega prahu oziroma peloda. Pelod dreves in grmovnic, pelodi trav (tudi žit) in plevelov (zeli), sestavljajo veliko skupino inhalacijskih alergenov, ki pridejo v telo skozi dihala. Pelodi so razmeroma veliki - približno 0,05 mm, zato se jih večina ustavi v nosu in na očesni veznici, ne pridejo pa v pljuča. Pelod vetrocvetk je najbolj alergen, ker se prenaša z vetrom in ga je v zraku veliko, potuje pa lahko tudi do 10 km daleč. Kadar se pelod oprime prašnih delcev, ga najdemo v zraku tudi zunaj sezone cvetenja. Pelod dreves se začne pojavljati v zraku že januarja, ko zacvetita leska in jelša, aprila cveti breza, do konca maja pa še druge drevesne vrste. Pelod trav je najpogostejši povzročitelj alergije od maja do konca julija. Ko je v kubičnem metru zraka 20 pelodnih zrn, se pojavijo vnete oči in nahod. Koledar cvetenja za Slovenijo je objavljen na spletnih straneh <http://www.arso.gov.si/vreme/napovedi%20in%20podatki/bio.html>

Testi: specifični IgE proti navedenim alergenom

Koda	Naziv alergena
	<b>Pelodi trav</b>
<b>g3</b>	<i>Dactylis glomerata</i> - pasja trava

<b>g6</b>	<i>Phleum pratense</i> - travniški mačji rep
<b>g8</b>	<i>Poa pratensis</i> - travniška latovka
<b>g16</b>	<i>Alopecurus pratensis</i> - travniški lisičji rep
<b>g12</b>	<i>Secale cereale</i> - rž
	<b>Pelodi plevelov (zeli brez trav)</b>
<b>w1</b>	<i>Ambrosia elatior</i> - pelinolistna žvrklja (ambrozija)
<b>w6</b>	<i>Artemisia vulgaris</i> - navadni pelin
<b>w7</b>	<i>Leucanthemum ircutianu</i> - navadna ivanjščica
<b>w8</b>	<i>Taraxacum officinale</i> - navadni regrat
<b>w9</b>	<i>Plantago lanceolata</i> - ozkolistni trpotec
<b>w20</b>	<i>Urtica dioica</i> - velika kopriva
<b>w19</b>	<i>Parietaria officinalis</i> - navadna krišina
	<b>Pelodi dreves</b>
<b>t2</b>	<i>Alnus incana</i> - siva jelša
<b>t3</b>	<i>Betula verrucosa</i> - navadna breza
<b>t4</b>	<i>Corylus avellana</i> - navadna leska
<b>t9</b>	<i>Olea europaea</i> - divja oljka
<b>t12</b>	<i>Salix caprea</i> - iva (vrsta vrbe)
<b>t14</b>	<i>Populus deltoides</i> - ameriški črni topol
<b>t15</b>	<i>Fraxinus American</i> - ameriški jesen
<b>t19</b>	<i>Acacia longifolia</i> - dolgolistna akacija
<b>t23</b>	<i>Cupressus sempervirens</i> - vednozelena cipresa
<b>t203</b>	<i>Aesculus hippocastanum</i> - navadni divji kostanj (okrasni kostanj)
<b>t205</b>	<i>Sambucus nigra</i> - črni bezeg
<b>t208</b>	<i>Tilia cordata</i> - lipovec

**Specifični IgE proti nesezonskim inhalacijskim alergenom (pršice, mikroorganizmi, pokožice in živalski proteini)**

**Indikacije:** Celoletni alergijski rinitis, alergijska astma

**Vzorec:** 3 – 5 ml venske krvi brez antikoagulantov (serumski odvzem) ali 1,5 do 3 ml seruma

#### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

Celoletni alergijski rinitis oziroma celoletni alergijski nahod se pojavlja neodvisno od letnega časa. Pri nekaterih lahko traja celo leto; zlasti pri tistih, ki so alergični na pršico v hišnem prahu, in pa pri tistih, kjer je vzrok alergije delovno okolje (moka pri pekih, živalske pokožnice in proteini pri rejcih živali, skladiščne pršice pri delavcih v prehranski industriji).

Astma je kronična vnetna bolezen malih dihalnih poti, ki se pod vplivom določenih snovi zožijo, zato je dihanje oteženo. Astma se pojavlja pri ljudeh, ki imajo preveč občutljive bronhije oziroma se ti prehitro vzdražijo (bronhialna prevzdražljivost). Te ljudi nekatere snovi dražijo in povzročajo napad težkega dihanja. Kadar v proces ni vključen določen alergen in napade težkega dihanja sprožijo na primer samo mrzel zrak, megla, stres in intenzivna čustva, govorimo o nealergijski astmi. Če pa zožanje malih dihalnih poti povzroči alergen, govorimo o alergijski astmi.

Vir alergenov so pršice hišnega prahu, glive in domače živali.

**Pršice** so taksonomsko razvrščene v skupino pajkovcev. Poznamo ogromno vrst, ki živijo v različnih biotopih. Za razvoj alergije so pomembne pršice, ki živijo v hišnem prahu in drugem hišnem okolju (postelja) in skladiščne pršice v skladiščih s hrano. Alergeni so njihovi izločki. Najpogostejša je senzibilizacija na alergene hišnih pršic, pomembni sta dve vrsti: **hišni kožojed** (*Dermatophagoides pteronissinus*) in **moknati kožojed** (*Dermatophagoides farinae*). Obe živita v hišnem okolju (prah, postelja, talne obloge) in ne v moki, kot bi lahko sklepali iz imena. D. farinae. Hišne pršice se hranijo s prhljajem in z mikroskopsko majhnimi plesnimi. Pri veliki koncentraciji pršic v hišnem okolju lahko pride do razvoja astme.

**Nekatere glive (večinoma plesni, pa tudi nekatere kvasovke)** sprožijo z IgE pogojeno alergijsko reakcijo, in z njo povezano astmo, lahko pa tudi IgG odziv in alergijski alveolitis (farmarska pljuča). Vir alergenov so spore, pa tudi drugi delci plesni. Poznamo veliko vrst plesni, razširjene so povsod po svetu, tako v naravi kot v zaprtih prostorih. Za razvoj potrebujejo vlažno okolje. Naselijo se v vlažnih stanovanjskih prostorih kot so kopalnice, kuhinje ali kletni prostori. Najdemo jih tudi na zunanjih stenah slabo izoliranih stavb. V razmnoževalnem procesu tvorijo plesni spore, ki, podobno kot pelod, lahko pridejo v dihalne poti in pri preobčutljivih ljudeh sprožijo reakcijo. Število spor v zraku je, podobno kot pri pelodu, odvisno od vremena. Največ spor je v zraku v vročem in vlažnem vremenu.

**Živalske pokožnice (epiteliji) in proteini:** Alergije na domače živali so pogoste in lahko poslabšajo druge alergije. Alergeni domačih živali so v prhljaju, slini psov, mačk in konj, v seču psov, mačk in malih živali (npr. hrčka, morskega prašička), v prhljaju, v žlezni izločkih. Alergeni se prilepijo na dlako in perje, ki odpada, se drobi v prah, ki ga vdihavamo. Najpogostejša je senzibilizacija na mačje alergene. Rejci živali se lahko senzibilizirajo na pokožnice in proteine živali, ki jih gojijo.

Testi: specifični IgE proti navedenim alergenom

	<b>Pršice</b>
<b>d1</b>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> - hišni kožojed (hišna pršica)
<b>d2</b>	<i>Dermatophagoides farinae</i> - moknati kožojed (hišna pršica)
	<b>Mikroorganizmi</b>
<b>m1</b>	<i>Penicillium notatum</i>
<b>m2</b>	<i>Cladosporium herbarum</i>
<b>m3</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<b>m4</b>	<i>Mucor racemosus</i>
<b>m5</b>	<i>Candida albicans</i>
<b>m6</b>	<i>Alternaria alternate</i>
<b>m207</b>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>m223</b>	Stafilokokni enterotoksin C*
<b>m224</b>	Stafilokokni enterotoksin D*
<b>m226</b>	Stafilokokni enterotoksin TSST*
<b>m227</b>	<i>Malassezia spp.</i>
<b>Gm22</b>	<i>Micropolyspora faeni</i>
<b>Gm23</b>	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
<b>Gmx6</b>	Mešanica plesni 6 ( <i>Penicillium notatum</i> / m1; <i>Cladosporium herbarum</i> /Gm2; <i>Mucor</i>
<b>Gmx7</b>	Mešanica plesni in bakterij 7 ( <i>Micropolyspora faeni</i> /Gm22;

\*ni inhalacijski allergen

	<b>Pokožnice (epidermisi) in živalski proteini</b>
<b>Ge91</b>	Golob - serumski proteini, perje, iztrebki
<b>e70</b>	Gos - perje
<b>e201</b>	Kanarček - perje

<b>e3</b>	Konj - prhljaj
<b>e80</b>	Koza - epitelij
<b>e4</b>	Krava - prhljaj
<b>e82</b>	Kunec - epitelij
<b>e85</b>	Kura, piščanec - perje
<b>e1</b>	Mačka - epitelij in prhljaj
<b>e81</b>	Ovca - epitelij
<b>e213</b>	Papiga - perje
<b>Ge92</b>	Papiga - serumski proteini, perje, iztrebki
<b>e78</b>	Papiga skobčevka - perje
<b>e2</b>	Pes - epitelij
<b>e5</b>	Pes - prhljaj
<b>e87</b>	Podgana - epitelij, serumski proteini, proteini iz urina
<b>e83</b>	Prašič - epitelij
<b>e89</b>	Puran - perje
<b>e86</b>	Raca - perje
<b>ex1</b>	Živalski prhljaj (mačka - epitelij in prhljaj/e1; konj - prhljaj/e3; krava - prhljaj/e4; pes -
<b>ex71</b>	Mešanica perja (gos - perje/e70; kura, piščanec - perje/e85; raca - perje/e86; puran -
<b>ex72</b>	Mešanica perja (papiga skobčevka - perje/e78; papiga - perje/e213; kanarček -

### Specifični IgE proti prehranskim alergenom

**Indikacije:** urtikarija, angioedem, atopijski dermatitis, oralni alergijski sindrom, kolike dojenčkov, kri v blatu pri dojenčkih, krči, slabost, bruhanje, diareja, abdominalna bolečina, anafilaktična reakcija po hrani (prehranski alergeni, ki lahko sprožijo anafilaktično reakcijo: arašidi, oreški, jajce, kravje mleko, ribe, raki in školjke, sezam, soja).

**Vzorec:** Vzorec: 3 – 5 ml venske krvi brez antikoagulatnov (serumski odvzem) ali 1,5 do 3 ml seruma (glede na število izbranih alergenov)

**Senzibilizacija s prehranskimi alergeni** je kompleksno dogajanje, ki ima tudi zelo različne posledice; od popolne odsotnosti boleznjskih znakov, do najhujših sistemskih reakcij kot je npr. anafilaksija. Prehranske alergije so najpogostejše v **otročtvu**, zlasti v prvem letu življenja, predvsem na **kravje mleko** in **jajčni beljak**, lahko pa tudi na jajčni rumenjaki, pšenico in druge alergene.

Pri dojenčkih in majhnih otrocih je pomembno dokazati vzorec senzibilizacije: ali gre za prehodno senzibilizacijo, ki največkrat izzveni do 4. leta starosti ali pa za dolgotrajno senzibilizacijo, ki se ji kasneje pridruži še senzibilizacija na inhalatorne alergene in razvoj astme.

Urtikarija (koprivnica) je lahko akutna (traja nekaj ur do nekaj dni in je ponavadi posledica alergije) ali kronična (traja nekaj tednov ali mesecev in je redko posledica alergije). Vzroki so lahko alergija na hrano, zdravila, pike žuželk, cvetni prah, plesni.

Atopijski dermatitis se večinoma pojavi že zelo zgodaj v otroštvu, pogosto že pri dopolnjenih treh mesecih starosti, v 80 odstotkih pa do dopolnjenega prvega leta. Bolezen traja več let. Pri dveh tretjinah otrok izgine okrog šestega leta, pri nekaterih pa lahko traja vse življenje.

Testi: specifični IgE proti navedenim alergenom

	<b>Hrana - sadje in zelenjava</b>
<b>f48</b>	Čebula
<b>f47</b>	Česen

f291	Cvetača
f216	Glavnato zelje
f31	Korenček
f35	Krompir
f244	Kumara
f225	Navadna buča
f218	Paprika
f25	Paradižnik
f261	Špargelj - <i>Asparagus officinalis</i>
f214	Špinača
f85	Zelena
f92	Banana
f95	Breskev
f242	Češnja
f259	Grozdje
f94	Hruška
f49	Jabolko
f44	Jagode
f84	Kivi
f208	Limona
f33	Pomaranča
f255	Sliva
	<b>Hrana - semena, stročnice in oreški</b>
f13	Arašidi
f226	Bučno seme
f79	Gluten
f6	Ječmen
f8	Koruzno zrnje
f17	Lešnik
f20	Mandelj
f11	Navadna ajda
f15	Navadni fižol
f256	Oreh
f7	Oves
f4	Pšenica
f9	Riž
f5	Rž
f10	Sezamovo seme
f14	Soja
f12	Vrtni grah

	<b>Hrana - začimbe</b>
f86	Peteršilj
	<b>Hrana - ribe, raki in mehkužci</b>
f258	Ligenj
f24	Rakci (kozice)
f307	Ribe (oslič)
f206	Ribe (skuša)
f3	Ribe (trska/polenovka)
f40	Ribe (tuna)

<b>f37</b>	Školjke (užitna klapavica)
	<b>Hrana - jajca in perutnina</b>
<b>f1</b>	Jajčni beljak
<b>f75</b>	Jajčni rumenjaki
<b>f83</b>	Kurje (piščančje) meso
<b>f284</b>	Puranje meso
	<b>Hrana - meso</b>
<b>f27</b>	Govedo
<b>f88</b>	Ovca, jagnje
<b>f26</b>	Prašič
	<b>Hrana - mleko</b>
<b>f2 #</b>	Kravje mleko
<b>f77</b>	Laktoglobulin beta
<b>f78</b>	Kazein
	<b>Hrana - razno</b>
<b>F324</b>	Hmelj - <i>Humulus lupulus</i> (storžek)
<b>f93</b>	Kakav
<b>f212</b>	Šampinjoni, gojeni

**Specifični IgE proti drugim skupinam alergenov:** žuželke in strupi žuželk (kožekrilci), zdravila, poklicni alergeni, paraziti

Testi: specifični IgE proti navedenim alergenom

	<b>Žuželke</b>
<b>i71</b>	Navadni komar
	<b>Strupi kožekrilcev</b>
<b>i1</b>	Domača čebela
<b>i3</b>	Osa
<b>i75</b>	Sršen
	<b>Zdravila</b>
<b>c1</b>	Peniciloil G
<b>c2</b>	Peniciloil V
<b>c5</b>	Ampiciloil
<b>c6</b>	Amoksiciloil
<b>c7</b>	Cefaklor
<b>c70</b>	Inzulin – svinjski
<b>c73</b>	Inzulin – humani
<b>c74</b>	Goveja želatina
<b>Rc208</b>	Tetanusni toksoid
	<b>Poklicni alergeni</b>
<b>k70</b>	Nepražena kavna zrna
<b>k73</b>	Odpadki pri izdelavi svile
<b>k83</b>	Seme bombaževca

<b>k78</b>	Etilenoksid
<b>k80</b>	Formaldehid (Formalin)
<b>k82</b>	Lateks
<b>k87</b>	Alfa-amilaza
<b>pax 5</b>	Izocianati ( TDI , MDI, HDI )
<b>pax 6</b>	PAX 6 (etilenoksid/k78; ftalični anhidrid/k79; formaldehid/k80; kloramin T/k85)
	<b>Paraziti</b>
<b>p1</b>	Ascaris – askaris
<b>p2</b>	Echinococcus – ehinokok

**Specifični IgG proti alergenom plesni in perja ptičev iz domačega okolja pri diagnostiki alergijskega alveolitisa (farmarska pljuča)**

**Indikacije:** alergijski alveolitis

**Vzorec:** 3,5 ml krvi brez antikoagulantov (serumski odvzem)– ali 1 ml seruma

Merimo specifični IgG proti antigenom, ki povzročajo z IgG pogojeno alergijo (preobčutljivost tipa II in III).

Testi: specifični IgG proti navedenim alergenom

<i>Aspergillus fumigatus</i>	Gm3
<i>Candida albicans</i>	Gm5
<i>Micropolyspora faeni</i>	Gm22
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	Gm23
Mešanica plesni 6 ( <i>Penicillium notatum/ m1; Cladosporium herbarum/Gm2; Mucor</i>	Gmx6
Mešanica plesni in bakterij 7 ( <i>Micropolyspora faeni/Gm22; Thermoactinomyces</i>	Gmx7
Gos - perje	e70
Kura, piščanec - perje	e85
Kanarček - perje	e201
Golob – serumski proteini, perje, iztrebki	Ge91
Papiga (serumski proteini, perje, iztrebki)	Ge92
Mešanica perja (gos - perje/e70; kura, piščanec - perje/e85; raca - perje/e86;	ex71
Mešanica perja (papiga skobčevka - perje/e78; papiga - perje/e213; kanarček -	ex72

## BAT - Celični in vitro test aktivacije bazofilcev z alergeni

**Indikacije:** diagnoza od IgE odvisnih preobčutljivosti za vdihane alergene, lateks, hrano, zdravila in strupe kožokrilcev

**Vzorec:** Za izvedbo preiskave potrebujemo 2-3 ml venske krvi, odvzete v epruveto za vakuumski odvzem z antikoagulantom (EDTA).

### Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

BAT (Basophil activation test) je metoda, ki meri izražanje **CD63** na površini bazofilcev ob stimulaciji z alergeni.

CD63 je glikoprotein, ki je pri neaktiviranih bazofilcih del membran histaminskih granul, ki se nahajajo znotrajcelično. Pri aktivaciji bazofilcev pride do zlivanja granul s celično membrano (eksocitoza histamina) in se CD63 pojavi na površini bazofilcev, kar se izmeri s pretočno citometrijo. V diagnostiki se BAT uporablja pri diagnozi od IgE odvisnih preobčutljivosti za vdihane alergene, lateks, hrano, zdravila in strupe kožokrilcev. BAT je najmanj enako ali bolj specifičen v primerjavi z določanjem IgE s kožnimi vbodnimi testi. Pri preobčutljivosti na strupe kožokrilcev, BAT bolj specifično od vbodnih testov ločuje med strupi čebel in os, ker ne zazna protiteles proti ogljikohidratnim epitopom, ki povzročajo križno reaktivnost, klinično pa niso pomembni. Zato v tem primeru BAT omogoča izbiro antigena za desenzibilizacijo.

### Alergeni

šifra seta	alergen
91A	PENICILIN G (BENZILPENICILIN)
91B	BENZILPENICILOILPOLILIZIN (PPL)
91C	MEŠANICA MINOR DETERMINANT (MDM)
91D	AMOKSICILIN
91E	CEFAZOLIN
91F	CEFUROKSIM
91G	SULFAMETOKSAZOL
91H	KLARITROMICIN
91I	OSA
91J	ČEBELA
91K	PENICILIN V (FENOKSIMETILPENICILIN)
91L	CEFTRIAKSON

Rezultat testa se podaja kot odstotek CD63 pozitivnih bazofilcev pri negativni kontroli (spontano izražanje) in odstotek CD63 pozitivnih bazofilcev pri posameznih alergeni. V primeru, da je slednja vrednost  $\geq 5\%$  se vpiše tudi stimulacijski indeks (sicer se ga iz izvida izbriše). Rezultati, pri katerih je odstotek izražanja CD63 na bazofilcih po dodatku alergena  $\geq 5\%$  in je hkrati SI  $\geq 2$ , so pozitivni. Če vsaj eden od teh pogojev ni izpolnjen, je rezultat negativen.



## Testi celične apoptoze in nekroze

### Analiza deleža celic s fragmentacijo DNA z metodo TUNEL

**Indikacije:** določitev deleža spermijev s fragmentirano (poškodovano) DNA pri težavah z oploditvijo, določitev deleža levkocitov s fragmentirano (poškodovano) DNA pri izpostavljenosti škodljivostim (citostatska terapija, sevanje, toksične snovi).

**Vzorec:** 3 ml epruveta – kri (EDTA), 1 ml semenske tekočine.

Test:

- TUNEL – fragmentacija DNA

### Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

TUNEL(TdT-mediated- dUTPX nick end labeling) tehnika je najbolj specifična metoda za določevanje apoptotičnih celic. V pozni fazi apoptoze pride do fragmentacije jedrne DNK. V programu apoptoze se aktivirajo endonukleaze, ki razrežejo DNK na kratke fragmente, ki so dolgi 50-300 baznih parov in imajo izpostavljene 3'-OH proste konce.

TUNEL je metoda merjenja fragmentacije DNK na nivoju posameznih celic. Fragmentacija DNK je ključni dogodek pri celični apoptozi, zato z metodo TUNEL izmerimo odstotek celic, ki so v fazi apoptoze. TUNEL je encimska metoda, pri kateri cepitve DNK prikažemo z označevanjem prostih 3'-OH koncev z modificiranimi nukleotidi v encimski reakciji. Pri tem encim terminalna deoksinukleotidil transferaza katalizira polimerizacijo fluorescenčno označenih nukleotidov na prostih 3'-OH koncih v matrika neodvisnem načinu. Celično DNK označimo z modificiranimi nukleotidi ob uporabi encima (terminalne transferaze ali pa DNK polimeraze I). Vgrajeni nukleotidi povzročijo celično fluorescenco, svetleče celice pa detektiramo na pretočnem citometru. Z metodo TUNEL je mogoče analizirati celice v suspenziji, adherentne celice, tkivu in parafinskih tkivnih rezinah. Merjenje deleža apoptotičnih celic omogoča oceno viabilnih spermijev, ki so zmožni oploditve pri metodah asistirane oploditve (IVF).

### Merjenje apoptotične izgube asimetrije membrane z aneksin V

**Indikacije:** Določitev deleža apoptotičnih spermijev pri težavah z oploditvijo, določitev deleža apoptotičnih levkocitov pri izpostavljenosti škodljivostim (citostatska terapija, sevanje, toksične snovi)

**Vzorec:** 3 ml epruveta – kri (EDTA), 1 ml semenske tekočine

Test:

- aneksin V - apoptoza

## Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

Celice vzdržujejo asimetrično porazdelitev različnih fosfolipidov glede na zunanjo in notranjo plast celične membrane. Tako se v zunanji plasti membrane nahajajo predvsem fosfolipidi, ki vsebujejo holin - fosfatidilholin, in sfingomielin, v notranji plasti membrane (na citoplazemski strani) pa aminofosfolipidi - fosfatidiletanolamin in fosfatidilserin (PS). Celice, ki izpostavijo PS na zunanjo stran membrane, omogočijo makrofagom in drugim fagocitom specifično prepoznavanje teh umirajočih celic, ki jih tudi kasneje fagocitirajo. Za prikaz izgube asimetrije membrane se uporablja aneksin V, ki močno in specifično reagira s fosfatidilserinom v prisotnosti kalcija. Apoptotične celice označene z konjugiranim aneksinom V lahko opazujemo s svetlobnim mikroskopom ali pa s pretočno citometrijo. PS se izpostavlja takoj za aktivacijo kaspaz in je eden od zgodnjih dogodkov apoptoze. Z metodami za dokazovanje apoptoze (TUNEL metoda, ugotavljanje DNA-fragmentov, elektronska mikroskopija) so ugotovili, da se PS izpostavi na zunanji strani membrane veliko prej, kot se začne razgradnja jedrne ovojnice in kondenzacija kromogena. V zgodnji stopnji apoptoze pride tudi do razgradnje citokeratina, ki je sestavni del citoskeleta. Celice so označili z aneksinom V in protitelesi anti-citokeratin in s pretočnim citometrom ugotovili, da se PS izpostavi prej kot nastopi kondenzacija citokeratina. Vsi ti poizkusi kažejo, da je izguba asimetrije membrane zgodnji pokazatelj apoptoze, ki sledi kaspazni proteolitični kaskadi in se pojavi pred razgradnjo jedrne ovojnice, kondenzacijo kromatina in razgradnjo citoskeleta.

Aneksin V, ki je označen z fluorescein izotiocianatom FITC se na fosfatidilserin veže z veliko afiniteto in celice, ki vstopajo v apoptozo pod fluorescenčnim mikroskopom svetijo zeleno. Da pa bi apoptotične celice ločili od nekrotičnih in poznejših stopenj apoptoze, dodamo celični suspenziji propidijev jodid, ki ne more skozi membrano zdravih celic. Propidijev jodid oddaja rdečo svetlobo in celice, ki imajo prepustno membrano – so nekrotične oz. apoptotične svetijo rdeče.

## Merjenje elektrostatskega potenciala mitohondrijev z DiOC6(3)

**Indikacije:** določitev deleža apoptotičnih spermijev pri težavah z oploditvijo, določitev deleža apoptotičnih levkocitov pri izpostavljenosti škodljivostim (citostatska terapija, sevanje, toksične snovi).

**Vzorec:** 3 ml epruveta – kri (EDTA), 1 ml semenske tekočine.

### Test:

- Elektrostatski potencial mitohondrijev z DiOC6 - apoptoza

## Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

V zgodnji stopnji eksekucijske faze apoptoze se poruši transmembranski potencial mitohondrijev, nastanejo megakanali, posledica tega pa je izpostavitvev PS na zunanji sloj citoplazemske membrane. Zaradi nastanka megakanalov v mitohondrijih se sprosti apoptozni inducirajoči faktor in citokrom C, ki aktivira kaspaze in s tem povzroči apoptotične spremembe. Obenem se poruši elektrostatski potencial na mitohondrijski membrani, ki ga vzdržuje predvsem aktivno črpanje vodikovih ionov iz mitohondrija. Potenciometrična barvila so pomembno orodje za merjenje membranskega potenciala (transmembranski potencial mitohondrijev je približno 150mV, negativen v matriksu mitohondrija) in ocene viabilnosti celic. DiOC6(3) (Molecular Probes) je karbocianatno barvilo, ki se najbolj uporablja

za zaznavanje membranskega potenciala. To kationsko barvilo se nakopiči na hiperpolarizirani (notranji) strani membrane in se potem vsidra v membrano. Količina barvila, ki se veže v membrano pa je odvisna od mitohondrijskega potenciala. S padanjem transmembranskega potenciala (zaradi apoptotičnega nastanka megakanalov) se zmanjša količina vezanega barvila in s tam tudi celična fluorescenca.

Potenciometrična barvila so pomembno orodje za merjenje membranskega potenciala (transmembranski potencial mitohondrijev je približno 150mV, negativen v matriksu mitohondrija) in ocene viabilnosti celic.

## **Kvantifikacija matičnih CD34+ celic**

Izvajanje kvantifikacije matičnih celic iz popkovnične krvi po standardiziranem protokolu (ISHAGE) omogoča dokumentacijo o količini matičnih celic v popkovnični krvi, ki se zamrzuje za kasnejšo uporabo. Pri pacientu preiskava omogoči presojo o nadaljnjih postopkih glede terapije ali odvzema krvi za morebitno presaditev kostnega mozga.

Izvajanje kvantifikacije matičnih celic iz popkovnične krvi poteka po standardiziranem protokolu (ISHAGE) z reagentom CD45FITC/CD34PE (BD Art. 341071 CD45FITC/CD34PE (ISHAGE)) in hkratno uporabo reagenta BD Via-Probe 7-AAD (BD Art. 559925), ki omogoča določanje odstotka VIABILNIH matičnih celic CD34+ med levkociti (ki so označeni s CD45). Z reagentom BD TruCount izmerimo tudi ABSOLUTNO KONCENTRACIJO CELIC CD34 v vzorcu (v celicah /ml vzorca).

### **Priporočila:**

Ameriški standard za matične celice iz popkovnice <https://web.emmes.com/study/cord/sop.htm>

British Journal of Heamatology 2009;147(2)

NetCord-FACT International Standards for Cord Blood Collection, Banking, and Release for Administration, Fourth Edition Fourth Edition, January 2010

[http://www.factwebsite.org/uploadedFiles/News/4th\\_Edition\\_Cord\\_Blood\\_Standards\\_4.0.pdf](http://www.factwebsite.org/uploadedFiles/News/4th_Edition_Cord_Blood_Standards_4.0.pdf)

EUROCORD-ED - European Online Cord Blood Learning Portal for use by Doctors, Nurses, Midwives, Surgeons, UCB Processing & Testing Laboratories, Scientists and Study Groups

<http://www.eurocord-ed.org/>

## Specifično imunološko testiranje pri sumu na posamezne bolezni oz. patološka stanja

**Testiranje za nosilstvo molekul HLA B27** (ankilizirajoči spondilitis, revmatske bolezni)

**Vzorec:** 2-3 ml (minimalno 1 ml) venske krvi, odvzete v epruveto za vakuumski odvzem z antikoagulantom (heparin ali EDTA). Test izvedemo najkasneje v 48 urah po odvzemu krvi.

Test:

- HLA B27

### Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

Preiskava je namenjena določanju limfocitov T, ki imajo na svoji površini molekule HLA-B27. **HLA-B27** je ena od molekul pglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa razreda I. Prisotnost omenjenih molekul je povezana z nastankom nekaterih revmatskih bolezni, predvsem ankilizirajočega spondilitisa. Preiskava temelji na vezavi monoklonskih protiteles na površinske levkocitne antigene limfocitov v vzorcu polne krvi. Z metodo pretočne citometrije izmerimo, ali so se anti HLA-B27 protitelesa vezala na limfocite T (preiskovanec je HLA-B27 pozitiven) ali pa se na limfocite T niso vezala (preiskovanec je HLA-B27 negativen). Številne študije kažejo, da nekatere bolezni ali zapleti bolezni nastajajo zlasti v kombinaciji z dedovanjem molekul HLA-B27. V zdravi populaciji je 5-10% HLA-B27 pozitivnih ljudi, med bolniki z ankilizirajočim spondilitisom pa jih je 90-100%. Med bolniki z Reiterjevim sindromom je 80% HLA-B27 pozitivnih. Med obolelimi za salmonelozo in šigelozo je 5-10% HLA-B27 pozitivnih, vendar je med tistimi, ki v nadaljnjem poteku bolezni razvijejo artropatijo, kar 80-90% HLA-B27 pozitivnih. Podobno je 70-80% HLA-B27 pozitivnih med bolniki, ki v poteku ulceroznega kolitisa in Crohnove bolezni razvijejo sakroileitis. Med bolniki s psorizao, ki razvijejo sakroileitis, je približno 60% HLA-B27 pozitivnih.

## ALPS – avtoimunski limfoproliferativni sindrom

**Indikacije:** klinični sum na ALPS

**Vzorec:** 3 ml epruveta – kri (EDTA)

### Testi:

- Odstotek DNT (dvojno negativnih (CD4-CD8-) alfa/beta limfocitov T)
- Ekspresija Fas (CD95) na limfocitih T
- Limfocitne populacije (T, B, Th, Tc, NK)
- Regulatorni (CD25+++ ) limfociti T v krvi
- Naivni (CD27-) in spominski (CD27+) limfociti B
- Funkcijski test za apoptozo limfocitov
- Plazemske koncentracije citokinov FasL, IL-10,  $\gamma$ -IFN, IL-4, IL-5

### Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

Okvara ekspresije/delovanja apoptotičnega receptorja Fas (CD95), ki ga ob aktivaciji izpostavijo limfociti – nanj se lahko veže Fas L (ligand) kot potencialna negativna povratna zanka za aktivacijo limfocitov v določenih tkivih (npr. očesno zrklo) ali fizioloških stanjih (daljše vnetje, infekcija). Klinične posledice nezavrte uravnave limfocitne proliferacije: **nemaligna limfoproliferacija** (limfadenopatija, splenomegalija, hepatomegalija, poliklonska hiper IgG v plazmi, ekspanzija CD5+ limfocitov B, ekspanzija CD4-CD8- TCRalfa/beta+ limfocitov, ki tvorijo FasL in IL-10 (poskus homeostatske uravnave), povečana plazemska koncentracija FasL, IL-10, vitamina B12 in različnih avtoprotiteles.

**Avtoimunost** – (anemija, artritis, uveitis trombocitopenija, nevtropenija, hepatitis, glomerulonefritis, vaskulitis) **Imunski deficit** – zaradi hiperaktivnih negativnih povratnih zank (IL-10, FasL) **večja možnost nastanka limfomov.**

ALPS je lahko:

- genski defekt receptorja FAS /TNFRSF6) – ALPS Ia (v 75%)
- defekt genov za Fas L (ALPS Ib) ali kaspazo-10 (ALPS II)
- gensko nediagnosticsiran defekt (ALPS III) (v 20%)

Osnovni diagnostični kriteriji:

- kronična nemaligna hepatosplenomegalija in limfadenopatija
- nad 1% alfa-beta DNT med vsemi limfociti ali nad  $0,033 \times 10^9$  alfa-beta DNT / L

Ostale diagnostične značilnosti ALPS-a:

- povečana koncentracija aktiviranih (HLA DR+)
- povečana koncentracija citotoksičnih limfocitov CD8
- zmanjšana koncentracija CD4+ CD25+ limfocitov T
- zmanjšano razmerje CD4 / CD8
- zmanjšan delež spominskih limfocitov B (CD19+ CD27+)
- zmanjšana koncentracija limfocitov B

### **IPEX (Imunska disregulacija, Poliendokrinopatija, Enteropatija, X-vezan sindrom)**

**Indikacije:** klinični sum na IPEX

**Vzorec:** 3 ml epruveta – kri (EDTA)

#### Testi:

- Limfocitne populacije (T, B, Th, Tc, NK)
- Aktivirani limfociti Th (CD25+CD4+) in regulatorni limfociti Th (CD4+CD25+++)
- Aktivirani limfociti z markerji CD69 (zgodnja aktivacija), HLA DR (pozna aktivacija), CD71 (proliferacija) in CD95 (apoptoza)

### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

Vzrok IPEX je mutacija FOX-3 proteina, ki sodeluje pri nastanku regulatornih limfocitov T. Zato nastane povečana aktivacija, proliferacija in sekrecija proinflammatoryh citokinov limfocitov Th, povečano se tudi koncentracija Th, zmanjšana pa je koncentracija Treg (CD4+CD25++) in sekrecija protivnetnih citokinov (IL-10, TGFbeta).

## Hemofagocitni sindrom (limfohistiocitoza) - HFS

**Indikacije:** klinični sum na hemofagocitni sindrom

**Vzorec:** 3 ml epruveta – kri (EDTA)

### Testi:

- koncentracija topnega IL-2R
- Limfocitne populacije (T, B, Th, Tc, NK)
- Ekspresija FasR (CD95) na limfocitih T in celicah NK
- CBA - Human Fas Ligand (FASL) Flex Set
- CBA - Human Inflammation Kit (IL-8, IL-1  $\beta$ , IL-10, TNF, IL-12p70)

### Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

Hiperaktivacija limfocitov T in histiocitov, ki se v kostnem mozgu vidi kot hiperaktivacija makrofagov, ki požirajo lastne eritrocite, levkocite, trombocite – verjetno zaradi spremenjenih površin ob vnetju oz. antigenemiji. HFS pogosto nastane zaradi virusne okužbe oz. reaktivacije (EBV, CMV, hepatitis, B19, HIV) v zvezi s predhodnim sekundarnim imunodeficitnim stanjem (revmatska bolezen, tumor).

Značilnosti:

Citokini v serumu: povečana koncentracija topnega IL-2R, interferona gama, TNF alfa, IL-1, IL-6, IL-8, FasL;

Celice v krvi: zmanjšana koncentracija in citotoksična aktivnost celic NK, zmanjšana ekspresija perforina pri celicah NK, povečana ekspresija FasR (CD95) na limfocitih T in celicah NK.

## CVID - Splošna variabilna hipogamaglobulinemija

**Indikacije:** klinični sum na CVID

**Vzorec:** 3 ml epruveta – kri (EDTA)

### Testi:

- Limfocitne populacije - koncentracije (T, B, Th, Tc, NK, HLA-DR/CD3) – testni komplet Simulset
- Naivni – spominski limfociti T
- Naivni – spominski limfociti B
- Serumski IgG, IgA, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
- Anti tetanus titer; anti Hib – titer
- Izolacija DNA



## Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

*Splošna variabilna hipogamaglobulinemija* (angl. common variable immunodeficiency, CVID) je delno pomanjkanje vseh razredov protiteles. To je razmeroma pogosta dedna imunska pomanjkljivost (1:25000 – 1: 50000), ki se kaže s pogostimi pljučnicami, prebavnimi motnjami in povečano nagnjenostjo za razvoj avtoimunskih bolezni. Klinične težave se začnejo bodisi v zgodnjem otroštvu bodisi med 15. in 40. letom starosti. Gre za skupino različnih dednih okvar na ravni aktivacije celic T pomagalk (zmanjšano izločanje citokinov) in limfocitov B. Ker ne gre za eno samo vrsto genske okvare, so tudi pojavne oblike bolezni različne. Bolniki imajo zmanjšane krvne koncentracije protiteles, normalno ali zmanjšano število limfocitov B (CD19) in včasih tudi celic T pomagalk (CD4), obenem pa pogosto povečane krvne koncentracije citotoksičnih limfocitov T (CD8). Pogosto je tudi zmanjšano razmerje celic CD4/CD8 ( $<1$ ) in zmanjšana koncentracija naivnih (CD45RA) celic T pomagalk. Zaradi naštetih motenj je pri CVID praviloma okvarjena pomoč limfocitov T pri pozni diferenciaciji limfocitov B (vloga ICOS), zato je nenormalna tvorba spominskih limfocitov B in izotipski preklap. To se kaže kot zmanjšani deleži izotipsko preklopljenih IgM(-)IgD(-) spominskih (CD27+) limfocitov B CD27(+)IgM(-)IgD(-) (več kot 5% med PBL pri zdravih ljudeh). Povečani so deleži nediferenciranih limfocitov B v krvi (CD27(-)IgD(+)) in defektno preklopljenih limfocitov B (IgD-CD27+).

Značilnosti pretočne citometrije:

1. Zmanjšana koncentracija izotipsko preklopljenih IgM(-)IgD(-) spominskih (CD27+) limfocitov B CD27(+)IgM(-)IgD(-) (več kot 5% med PBL pri zdravih ljudeh)
2. Povečani deleži nediferenciranih limfocitov B v krvi:
  - Skupina MB0 (47%) Skoraj brez spominskih B (manj kot 0,4% med PBL), pretežno nediferencirani (IgD+CD27-)
  - Skupina MB1 (33%) pretežno nediferencirani (IgD+CD27-) in defektno preklopljeni (IgD+CD27+)
  - Skupina MB2 (19%) normalno spominskih B

## Glivične okužbe – serološki in antigenski testi

### Testi:

- Določanje protiteles proti glivam z imunodifuzijo
- Določanje protiteles IgA, IgM in IgG proti glivam *Aspergillus fumigatus* in *Candida albicans* z ELISA
- Določanje *Aspergillus spp.* galaktomanana z ELISA
- Določanje *Candida spp.* manana z ELISA
- Določanje protiteles proti mananskemu antigenu kandidate z ELISA
- Določanje antigena *Cryptococcus neoformans* z ELISA
- Določanje glikoproteinskega antigena *C.albicans*
- Določanje (1→3)-β-D-glukana

### **Določanje protiteles proti glivam z imunodifuzijo**

**Indikacije:** sum na okužbe z glivami.

**Vzorec:** 20 µl svežega človeškega seruma, Če serum pred preiskavo shranjujemo, ga hranimo največ sedem dni v hladilniku pri +2 do +8 °C, drugače ga moramo zamrzniti pri -22 do -18 °C ali manj.

### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

*In vitro* kvalitativno določanje specifičnih protiteles (precipitinov) proti glivam *Aspergillus spp.*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum* in *Coccidioides immitis* v serumu, z metodo dvojne imunodifuzije (ID) v agarozii (po Ouchterlony-ju), je namenjeno za serološko diagnostiko mikoz.

Raztopino protiteles in homolognega antigena nanese v ločeni vdolbinici, izrezani v agarozii, in v vlažni komori pustimo, da difundirata iz vdolbinic. Med vdolbinicama se vzpostavi koncentracijski gradient obeh reaktantov: presežek antigena je blizu vdolbinice s protitelesi, presežek protiteles pa v bližini vdolbinice z antigenom. Precipitacijska črta nastane v območju ekvivalence in jo vidimo s prostim očesom. Protitelesa s to metodo testiramo na »skladnost«, tako da bolnikov serum nanese v vdolbinico zraven vdolbinic s standardnim pripravkom. Če so kompleksi antigen-protitelo enaki, precipitacijska črta tvori neprekinjeno črto – od standardnega pripravka do bolnikovega seruma. Poleg reakcije popolne skladnosti protiteles, lahko opazimo tudi reakcijo delne skladnosti in reakcijo neskladnosti protiteles.

Metoda ni primerna za bolnike, ki so imunsko oslajbljeni in niso sposobni protitelesnega odziva proti glivam. Diagnostika mikoz pri bolniku terja upoštevanje več elementov - klinične slike, radioloških in bioloških izvidov (mikrobioloških, histoloških in seroloških).

## **In vitro določanje protiteles IgA, IgM in IgG proti glivam *Aspergillus fumigatus* in *Candida albicans* z ELISA**

**Indikacije:** spremljanje imunskega odziva bolnikov s povečanim tveganjem za površinsko in invazivno kandidozo ali aspergilozo.

**Vzorec:** 10 µl svežega človeškega seruma ali plazme. Če serum pred preiskavo shranjujemo, ga hranimo največ sedem dni v hladilniku pri +2 do +8 °C, drugače ga moramo zamrzniti pri -22 do -18 °C ali manj.

### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

S preiskavo kvalitativno in kvantitativno določamo protitelesa IgA, IgM in IgG proti *A.fumigatus* in *C.albicans* z metodo ELISA.

Gre za dvostopenjski encimskoimunski test v mikroplošči. Na mikroploščo je adsorbiran antigen aspergilusa ali kandidate. V prvi stopnji se z antigenom vežejo specifična protitelesa v bolnikovem serumu ali plazmi. V drugi stopnji dodamo encimski konjugat, to so protitelesa proti človeškim imunoglobulinom IgA, IgM ali IgG, konjugirana z alkalno fosfatazo. Če so v bolnikovem serumu ali plazmi specifična protitelesa proti glivi, se ta protitelesa vežejo v kompleks z antigenom in encimskim konjugatom in ga zasledimo z barvno reakcijo encima in substrata. Intenziteta obarvanega produkta je sorazmerna koncentraciji protiteles, ki jo določimo kolorimetrično.

Če je rezultat testa negativen, invazivne kandidoze ali aspergiloze ne smemo izključiti zaradi možnosti, da so bolniki imunsko oslabljeni in niso sposobni humoralnega odziva na glive.

## **Določanje *Aspergillus spp.* galaktomanana z ELISA**

**Indikacije:** zgodnja in specifična diagnostika okužb z *Aspergillus spp*

**Vzorec:** 300 µl človeškega seruma, 300 µl plazme, 300 µl BAL-a, 300 µl likvorja ali 300 µl urina.

### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

Gre za *in vitro* polkvantitativno določanje topnega aspergilusnega antigena – galaktomanana v različnih vzorcih z metodo ELISA. Metoda je vključena v kriterije za razvrstitev invazivne aspergiloze. Določanje galaktomanana s Platelia® *Aspergillus* kompletom je enostopenjski encimskoimunski test v mikroplošči. Galaktomanan v vzorcu se veže s protitelesi v kompleks in ga zasledimo z barvno reakcijo encima in substrata.

Metoda ima omejitve, če pride do navzkrižnih reakcij s polisaharidnimi antigeni gliv iz rodov *Penicillium*, *Paecilomyces* in *Alternaria*.

Če je rezultat Platelia testa pozitiven, še pred zaznavnimi radiološkimi in kliničnimi spremembami pri bolniku, je potrebno takšen rezultat obravnavati s previdnostjo. O pozitivnem testu brez kliničnih znakov poročajo pri majhnih otrocih in velikokrat se lahko izkaže, da gre za lažno pozitivne rezultate. Galaktofuranoza je v različnih prehrabnih izdelkih z žitaricami in v kremnih desertih pripravljenih z mlekom v prahu. Enaka pazljivost pri tolmačenju antigenemije velja tudi za bolnike s spremenjeno prebavno bariero.

Galaktomanan so zasledili tudi v nekaterih serijah piperacilina in amoksicilina vezanega s klavulansko kislino, zato moramo biti pozorni tudi pri pozitivnih testih ob sočasni terapiji s parenteralnimi pripravki polsintetičnih  $\beta$ -laktaminov.

### **Določanje *Candida spp. manana* z ELISA**

**Indikacije:** zgodnja in specifična diagnostika okužb s *Candida spp.*

**Vzorec:** 300  $\mu$ l svežega človeškega seruma ali plazme z antikoagulant, EDTA, heparin ali citrat, ali 300  $\mu$ l drugih telesnih tekočin.

### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

Gre za *in vitro* kvantitativno določanje topnega antigena kandidate – manana, v vzorcih, z metodo ELISA. Manan je polisaharid, ki je nekovalentno vezan na celično steno kvasovke in pri *C. albicans* sestavlja 7 % njene suhe teže. Prisotnost antigena v vzorcih je eden od poglavitnih pokazateljev invazivne kandidoze.

Diagnozo okužb s kandido je težko določiti, zlasti zaradi neznačilnih kliničnih znakov in slabe občutljivosti kultur. Za diagnostiko invazivnih kandidoz, ki je pomembno povezana z začetkom ustreznega zdravljenja, je zato priporočljivo uporabiti serološke metode in neposredne mikološke metode skupaj. Določanje manana v vzorcih imunsko oslabljenih bolnikov tako poveča verjetnost zgodnje diagnoze okužb s kandido.

Uspešnost zaznavanja manana v vzorcu je povezana s pogostnostjo opravljenih testov. Zato je pri močno rizičnih bolnikih priporočljivo redno testiranje manana in protiteles proti mananu. Oba testa skupaj povečata klinično občutljivost testiranja in zgodnje odkrivanje okužb s kandido.

Če je rezultat Platelia testa negativen, invazivne kandidoze ne smemo izključiti, ali zaradi močno zmanjšane koncentracije manana v vzorcu ali pa zaradi hitrega odstranjevanja manana med okužbo. Priporočljivo je tolmačenje rezultatov glede na prisotnost protiteles: celo v primerih invazivne kandidoze se lahko zgodi, da prisotnost protiteles zmanjša možnost pozitivne določitve antigena. Uporabnost testa ni opredeljena pri novorojenčkih in otrocih.

Možne so tudi križne reakcije s hidrosietilškrobom, ki ga bolniki prejemajo v terapiji motenj krvnega obtoka (kot je 6 % Hesteril), hemoragičnega šoka, septičnega šoka in hipovolemije. Lažno pozitiven rezultat se lahko pojavi pri vzorcih, ki vsebujejo več kot 60 g/l  $\gamma$ -globulinov ali pri bolnikih s protitelesi proti toksoplazmi.

### **Določanje protiteles proti mananskemu antigenu gliv *Candida spp.* z ELISA**

**Indikacije:** zgodnja diagnostika okužb s *Candida spp.*

**Vzorec:** svež humani serum ali plazma z antikoagulant, EDTA, heparin ali citrat.

### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

*In vitro* kvantitativno določanje protiteles proti antigenu celične stene glive *Candida spp.* – mananu, v serumu, z metodo ELISA, je namenjeno za zgodnjo diagnostiko okužb s *Candida spp.* Določanje

protiteles s Platelia® *Candida* Ab Plus je dvostopenjski indirektni encimskoimunski test v mikroplošči in omogoča kvantitativno določitev protiteles proti mananu v humanem serumu.

Določanje protiteles proti mananu in določanje manana v serumu bolnikov poveča verjetnost zgodnje diagnoze okužb s kandido.

### **Določanje glikoproteinskega antigena *C.albicans***

**Indikacije:** zgodnja diagnostika okužb s *Candida albicans*.

**Vzorec:** svež humani serum.

#### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

*In vitro* določanje citoplazemskega glikoproteinskega (gp) antigena *C.albicans* v serumu, z metodo aglutinacije lateksa.

Test temelji na principu, da lateksni delci prekriti s specifičnimi protitelesi proti kandidi aglutinirajo v prisotnosti gp antigena kandidate. Lateks je vezan s kunčjimi monoklonskimi protitelesi proti gp antigenu *C.albicans*. Serumski vzorec bolnika, ki povzroči aglutinacijo lateksa, je pozitiven na antigen *C.albicans* in mu moramo določiti titer. Titer vzorca je največja razredčina vzorca, ki še aglutinira lateksni reagent.

### **Določanje (1→3)-β-D-glukana**

**Indikacije:** podpora za diagnozo verjetne invazivne glivične bolezni.

**Vzorec:** serum, plazma, bal, likvor ali urin.

#### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

Je kolorimetrični test za kvantitativno določanje (1→3)-β-D-glukana. (1→3)-β-D-glukan je polisaharid celične stene številnih medicinsko pomembnih gliv. Test poteka po spremenjeni poti Limulus amebocitnega lizata (LAL) tako, da (1→3)-β-D-glukan sproži aktivacijo faktorja G. Reakcija se nadaljuje s pretvorbo neaktivnih encimov za strjevanje amebocitov v aktivne encime, vse do cepitve Boc-Leu-Gly-Arg-pNA kromogena v kromofor. Kromofor je peptid Boc-Leu-Gly-Arg, ki absorbira svetlobo pri 405 nm .

Dokazovanje (1→3)-β-D-glukana se uporablja kot podpora za diagnozo verjetne invazivne glivične bolezni, kot sta kandidoza in aspergiloza. Pozitiven rezultat testa pa nam ne da informacije o rodu glive, ki je povzročitelj infekcije. Določenih vrst gliv, kot so vrste iz rodu *Cryptococcus*, ki imajo malo (1→3)-β-D-glukana s testom ne moremo dokazati. Prav tako ne moremo dokazati zigomicet kot so, *Absidia*, *Mucor* in *Rhizopus*, ki nimajo (1→3)-β-D-glukana. S testom ne moremo dokazati *Blastomyces dermatitidis*, ki ima v kvasni obliki malo (1→3)-β-D-glukana.

### **Določanje antigena *Cryptococcus neoformans* z ELISA**

**Indikacije:** zgodnja in specifična diagnostika okužb s kvasovko *Cryptococcus neoformans*.

**Vzorec:** 50 µl svežega človeškega seruma ali likvorja. Za ostale vzorce uporaba ni priporočljiva.

## Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

Gre za *in vitro* kvantitativno ali polkvantitativno določanje kriptokoknega antigena v serumu in likvorju z metodo ELISA.

Test vsebuje antikriptokokna poliklonska protitelesa absorbirana na vdolbinice mikroplošče in detekcijski sistem, ki temelji na monoklonskem peroksidaznem konjugatu. Če je v vzorcu kriptokokni antigen, se formira kompleks med antigenom, encimskim konjugatom in na vdolbinice vezanim protitelesom. Po izpiranju nevezanega konjugata se doda raztopina substrata. Barva se razvije v prisotnosti vezanega encima, intenziteta barve pa je odvisna od količine prisotnega antigena.

Negativen rezultat ne izključuje diagnoze kriptokokoze, še posebej, če je bil testiran le en vzorec in pacient kaže znake značilne za kriptokokozo.

Pozitiven rezultat pokaže prisotnost kriptokoknega antigena.

V testu je pričakovati lažno pozitivne rezultate v primeru okužb s kvasovko *Trichosporon beigeli*, ker je bil lažno pozitiven rezultat opisan že v primeru dokazovanja kriptokokoze z lateksno aglutinacijo.

## **Bakterijske okužbe – serološki in antigeni testi**

### Testi:

- RPR (Rapid Plasma Reagin) flokulacijski test za dokazovanje protiteles pri sifilisu
- FTA-ABS (Fluorescent Treponemal Antibody – ABSorption test) imunofluorescenčni test za dokazovanje protiteles pri sifilisu
- RANDOX-TPHA (Posredni hemaglutinacijski test za odkrivanje protiteles proti antigenom bakterije *Treponema pallidum* v serumu)
- INNO-LIA™\* Syphilis Score
- INNO-LIA™\* Syphilis Score-IgM
- 19 S IgM, FTA-ABS (19 S IgM Fluorescent Treponemal Antibody – ABSorption test) imunofluorescenčni test za dokazovanje protiteles razreda IgM pri sifilisu
  
- *Helicobacter pylori*-IgA (ELISA-HP IgA)
- *Helicobacter pylori*-IgG (ELISA-HP IgG)
- Določanje antigena *Helicobacter pylori* v blatu
  
- Quantiferon gold(IT)- ugotavljanju celičnega imunskega odziva pri okužbi z bakterijo *Mycobacterium tuberculosis*
- Določanje protiteles proti *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, B in C, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* newport in *Salmonella* Typhimurium

### **RPR (Rapid Plasma Reagin) flokulacijski test za dokazovanje protiteles pri sifilisu**

**Indikacije:** sum na okužbo s *Treponema pallidum*.

**Vzorec:** serum ali plazma.

### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

Test se uporablja za dokazovanje reaginskih protiteles, ki nastanejo proti netreponemskim antigenom *Treponema pallidum* pri domnevnih bolnikih s sifilisom.

Test RPR je modernejša različica testa VDRL (angl. Venereal Disease Research Laboratories), ki je eden od treh testov, ki jih moramo obvezno izvesti, če hočemo v laboratoriju potrditi okužbo s *Treponema pallidum*. Tudi RPR test je netreponemski test, kjer se uporablja kot antigen kardiolipin. V testu RPR

je kardiolipin vezan na ogljene delce, kar omogoča preprostejše odčitavanje rezultata. Protitelesa, ki jih s testom določamo so antikardiolipinska protitelesa, ki jih včasih imenujemo tudi reagini.

Kadar so v preiskovančevi krvi navzoča reaginska protitelesa, nastane ob mešanju vzorca seruma ali plazme in testnega reagenta aglutinat (flokulacija), ki se kaže z s prostim očesom vidno grudasto usedlino.

S testom lahko dobimo lažno pozitivne rezultate kadar ima preiskovanec infekcijsko mononukleozo, virusno pljučnico, sistemski lupus eritematosus, malarijo ali lepro.

### **Imunofluorescenčni test za dokazovanje protiteles pri sifilisu FTA-ABS (Fluorescent Treponemal Antibody – ABSorption test)**

**Indikacije:** sum na okužbo s *Treponema pallidum*.

**Vzorec:** serum ali plazma.

#### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

FTA –ABS test je najobčutljivejši med klasičnimi testi za odkrivanje sifilitične okžbe. Protitelesa, ki pri bolniku nastanejo v nekaj tednih po okužbi, so uperjena proti specifičnim antigenom *Treponema pallidum* – antitreponemska protitelesa. Žal imajo nekatere podobne antigene tudi druge bakterije iz rodu *Treponema* in *Borrelia*. Te antigene odstranimo z absorpcijo s posebnim pripravkom, ki vsebuje zdrobljene bakterije *Treponema reiter* ( zato ABS). Po absorpciji preostanejo v vzorcu prosta torej le za *T. pallidum* specifična protitelesa.

Kadar so v preiskovančevi krvi navzoča antitreponemska protitelesa nastane ob mešanju vzorca seruma ali plazme in testnega reagenta imunski kompleks, ki vsebuje človeška protitelesa razredov IgG in IgM. Vezavo takšnih protiteles dokažemo z dodatkom antihumanih protiteles proti imunoglobulinom IgG ali IgM označenih s fluoresceinom. Test lahko daje lažno pozitivne rezultate kadar ima preiskovanec: lajmsko boreliozo (*Borrelia burgdorferi* sensu lato), leptospirozo (*Leptospira* sp.), gobavost (*Mycobacterium leprae*), sistemski lupus eritematosus ali hudo parodontozo povzročeno z ustnimi spirohetami.

### **RANDOX- TPHA (Posredni hemaglutinacijski test za odkrivanje protiteles proti antigenom bakterije *Treponema pallidum* v serumu)**

**Indikacije:** sum na okužbo s *Treponema pallidum*.

**Vzorec:** serum, plazma, likvor.

#### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

Test Radox-TPHA je posredni hemaglutinacijski test za odkrivanje specifičnih protiteles proti antigenom bakterije *Treponema pallidum* v človeškem serumu.

V testu so ovčji eritrociti, utrjeni z glutaraldehidom, prevlečeni z očiščenimi antigeni bakterije *Treponema pallidum* (sev Nichols). Protitelesa, ki jih bolnik razvije v času trajanja okužbe s sifilisom, se vežejo za te antigene in aglutinirajo eritrocite. Neprevlečeni, kontrolni eritrociti, ki jih vsebuje preizkusni komplet, ne reagirajo s protitelesi proti bakteriji *Treponema pallidum*. V testu služijo za



odkrivanje spontane-nespecifične aglutinacije ovčjih eritrocitov. Pozitivna kontrola, ki je vključena v preizkusnem kompletu, je namenjena preverjanju aglutinabilnosti testnih eritrocitov.

Test lahko da lažno pozitivne rezultate, kadar ima preiskovanec infekcijsko mononukleozo, virusno pljučnico, sistemski lupus eritematozus, malarijo ali lepro. Pri bolnikih okuženih istočasno s HIV-om in sifilisom je lahko test negativen ali so titri protiteles majhni.

### **INNO-LIA™\* Syphilis Score**

**Indikacije:** potrditev okužbe s *Treponema pallidum*.

**Vzorec:** serum, plazma.

#### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

INNO-LIA™ Syphilis Score je test imunskega pivnanja, ki se uporablja za dokazovanje prisotnosti specifičnih protiteles proti *Treponema pallidum* v človeškem serumu ali plazmi. Na najlonski trak s plastično podlago so nanešeni v ločenih pasovih trije rekombinantni proteini (TpN47, TpN17 in TpN15) in sintetični peptid (TnpA). Poleg treponemskih antigenov so na traku še štirje kontrolni pasovi: streptavidin, pozitivna kontrola 3+ (protitelesa proti človeškemu Ig), ki služi kot kontrola dodajanja vzorca, pozitivna kontrola 1+ (človeški IgG) in kalibrator občutljivosti (humani IgG). Če so v preiskovančevem vzorcu navzoča specifična protitelesa proti *Treponema pallidum* se bodo vezala na treponemske antigene nanešene na testnem traku. Na nastale imunske komplekse nato vežemo kozja protitelesa proti človeškim IgG, ki so označena z alkalno fosfatazo. Inkubacija v raztopini substrata povzroči obarvanje identifikacijskega pasu sorazmerno s količino specifičnih protiteles navzočih v vzorcu.

### **INNO-LIA™\* Syphilis Score-IgM**

**Indikacije:** potrditev okužbe s *Treponema pallidum*.

**Vzorec:** serum, plazma.

#### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

Sifilis je spolno prenosljiva bolezen, ki jo povzroča *Treponema pallidum*. Pri okužbi s sifilisom nastajajo protitelesa, ki nimajo zaščitne vloge, so pa diagnostično pomembna. S testom INNO-LIA™ določamo protitelesa proti specifičnim treponemskim antigenom in sintetičnemu antigenskemu peptidu TnpA.

INNO-LIA™ Syphilis Score je test imunskega pivnanja, ki se uporablja za dokazovanje prisotnosti specifičnih protiteles proti *Treponema pallidum* v človeškem serumu ali plazmi.

### ***Helicobacter pylori*-IgA (ELISA-HP IgA) in *Helicobacter pylori*-IgG (ELISA-HP IgG)**

**Indikacije:** sum na okužbo z bakterijo *Helicobacter pylori*.

**Vzorec:** serum.

#### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

Testa HP-IgA in HP- IgG se uporabljata za določevanje protiteles uperjenih proti bakteriji *Helicobacter pylori* v serumu.

Bakterija *Helicobacter pylori* je povzročiteljica vnetja v želodcu in dvanajsterniku. Povezujejo jo tudi z maligno alteracijo navedenih vnetij. Z antibiotiki in regulatorji protonskih črpalk lahko okužbo uspešno pozdravimo. Določanje specifičnih protiteles je uspešen način za spremljanje zdravljenja. Če je to uspešno se nivo protiteles ustrezno zmanjša.

### **Določanje antigena *Helicobacter pylori* v blatu**

**Indikacije:** sum na okužbo z bakterijo *Helicobacter pylori*.

**Vzorec:** blato.

### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

Preiskava je namenjena ugotavljanju ali izključitvi navzočnosti antigenov bakterije *Helicobacter pylori* v blatu.

Večina dosedanjih testov dokazuje navedeno bakterijo posredno – dihalni test, dokazovanje navzočnosti specifičnih protiteles v serumu, malo pa je neposrednih testov in še ti so navadno invazivni – neposredni dokaz bakterije v bioptičnem materialu, kultivacija na bakterioloških gojiščih. Test dokazovanja antigena bakterije *Helicobacter pylori* v blatu je neposreden hitri test, ki je posebno primeren za spremljanje zdravljenja okužbe. Odsotnost antigena *Helicobacter pylori* v blatu je znak uspešnega zdravljenja.

### **Quantiferon gold(IT)- ugotavljanju celičnega imunskega odziva pri okužbi z bakterijo *Mycobacterium tuberculosis***

**Indikacije:** sum na okužbo z bakterijo *Mycobacterium tuberculosis*.

**Vzorec:** kri odzvamemo v tri epruvete (Quantiferon TB Gold blood collection tubes, Cat No T0593-0201 in Cat No 05900201).

### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

Preiskava je namenjen ugotavljanju celičnega imunskega odziva pri okužbi z bakterijo *Mycobacterium tuberculosis*.

V primerih, ko je Mantouxov kožni test težko izvesti, je navedeni test dobrodošla različica za pomoč pri ugotavljanju okužbe z bacilom tuberkuloze. Test je hiter in temelji na predpostavki, da senzibilizirani limfociti T v navzočnosti specifičnega antigena sintetizirajo in izločijo IFN $\gamma$ . Iz količine IFN $\gamma$  v vzorcu sklepamo na moč odziva. Antigeni, ki jih uporabljamo za spodbujanje preiskovančevih limfocitov niso enaki tistim, ki jih uporabljamo za besežiranje, zato se odzovejo samo tisti limfociti, ki so prišli v stik s »pravimi« antigeni bakterije *Mycobacterium tuberculosis*.

V preiskovančevi krvi ugotavljamo navzočnost za antigene ESAT-6, CFP-10 in TB7.7 (p4) specifičnih limfocitov. Navzočnost IFN $\gamma$ , ki je nastal kot posledica aktivacije specifičnih limfocitov T merimo s prilagojenim EIA testom. Test je namenjen ugotavljanju okužbe in tudi bolezni skupaj s še drugimi preiskovalnimi metodami: bakteriološkim pregledom – kultura in radiološkim pregledom. Končno

diagnozo bolezni in s tem povezanimi ukrepi naredi zdravnik ob sočasnem pregledu vseh delnih izvidov.

### **Določanje protiteles proti *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, B in C, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* newport in *Salmonella* Typhimurium**

**Indikacije:** sum na okužbo s salmonelami.

**Vzorec:** serum, plazma.

#### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

Test serologija na salmonelo je aglutinacijski test, kot je klasičen Widalov test, z razliko, da ga izvajamo v mikrotitrski ploščici. Reagenti, ki jih uporabljamo so komercialni.

Uporablja se za dokaz navzočnosti protiteles proti *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, B in C, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* newport in *Salmonella* Typhimurium. Preiskava je pomembna za ugotavljanje okužbe z navedeno salmonelo, oziroma povezanosti možne revmatološke bolezni s predhodno okužbo z eno od navedenih salmonel in posledično imunske reaktivnostjo.

Test Serologija na salmonelo je namenjen določanju protiteles proti *S. Typhi*, *S. Paratyphi A, B in C*, *S. Enteritidis*, *S. Newport* in *S. Typhimurium*. Navzočnost protiteles v titru večjem od 1:100 pomeni aktiven stik z eno od navedenih salmonel. Imunski odziv na antigene salmonel nastaja tako, da nastanejo najprej protitelesa proti antigenom O (lahko že po enem tednu) in nato proti antigenom H (po 10 do 12 dneh). Titri so najvišji konec 3 in v začetku četrtega tedna bolezni. Protitelesa proti antigenom O so nižji kakor proti antigenom H. Protitelesa proti antigenom H lahko najdemo pri preboleznikih še po nekaj mesecih, medtem ko protitelesa proti antigenom O kmalu izginejo.

## **Drugo**

### Testi:

- Radioimunsko določanje gastrina

### **Radioimunsko določanje gastrina**

**Indikacije:** sum na motnje izločanja gastrina, megaloblastna anemija, gastrinom, karcinoidni tumorji, NET, MEN...

**Vzorec:** serum ali plazma, dobljena z EDTA.

### **Principi diagnostike in interpretacije rezultatov**

Gastrin je gastrointestinalni hormon, ki ga izločajo celice G v sluznici želodca in dvanajstnika.

Merimo količino celotnega gastrina na volumsko enoto seruma ali plazme z radioimunskim testom (RIA).