

Indikacije in interpretacije imunoloških testov

Alojz Ihan

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)

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/delat 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 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

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)

Določevanje citokinov

Določevanje koncentracije citokinov in topnih receptorjev z metodo ELISA

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

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

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)

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

Indikacije: sum na prirojeno okvaro protitelesnega imunskega odziva, preverjanje uspešnosti cepljenja in/ali zaščitnega nivoja protiteles za oceno potrebnosti ponovnega cepljenja (napr. 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

Meritve koncentracije IgA v slini

Indikacije: sum na prirojeno ali pridobljeno okvaro tvorbe sluzničnih protiteles (pogosti respiratorni infekti)

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

Prirojene motnje v koncentraciji serumskih protiteles so najpogostejši vzroki prirojelih 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 pomagalk, 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, CVID), Hiper IgM-sindrom, Pomanjkanje IgA

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 (napr. 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).

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.

IgA v slini so najpomembnejša protitelesa za zaščito sluznic pred okužbami. IgA se pri novorojencu začne ob mikrobnih stimulaciji 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.

Indikacije za preiskavo IgA v slini: Sum na prirojeni deficit IgA, Sum na nedozorelost črevesne sluznice (skupaj z merjenjem IgG v slini), Sum na sekundarni imunski deficit

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: 3ml epruveta - plazma (EDTA)

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 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 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

Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

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. SCIDi brez limfocitov T, limfociti B so v krvi (mutacija gena za receptor IL-2 (najpogostejša oblika), JAK3, receptor IL-7, tirozin fosfatazni 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: rekombinaznega gena RAG 1 ali RAG 2, mutacija gena Artemis, mutacija gena za encim adenozin 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. Imunodeficienca s povišanim IgM nastane zaradi mutiranega gena za protein CD40 na limfocitih B, ki normalno omogoča preklon protitelesne sinteze z IgM na ostale razrede imunoglobulinov. Bolniki imajo pomanjkanje IgG in IgA, vendar sintetizirajo velike količine poliklonalnih IgM. B celice ne morejo prekloniti 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 zmanjšana ali odsotna ekspresija CD154, kar se dokazuje v in vitro stimulacijskem testu.

Limfociti T – diferenciacija

Namen in področje uporabe

Limfociti T – diferenciacija je set preiskav, ki bolj celostno prikaže dozorevanje in diferenciacijo limfocitov T. Sestavljena je iz posameznih preiskav, in sicer limfocitnih populacij skupaj z aktiviranimi limfociti T, naivnih in spominskih limfocitov Th, celic RTE, celic TCR α/β DNT (CD4-CD8-) ter celic TCR α/β DNT (CD4-CD8-), limfocitov Th1, Th2, Th17 in Treg.

Limfociti T, nosilci celične imunosti, nastajajo v kostnem mozgu kot nezrele, nefunkcionalne celice T. V zrele imunokompetentne limfocite T (celice T pomagalko – CD4⁺CD3⁺ in citotoksične celice T - CD8⁺CD3⁺) dozori v timusu. Njihovo dozorevanje spremljata aktivacija in preurejanje genov za T-celični receptor (CD3). Limfociti T, ki dozori 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 Tymic 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- γ , 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**.

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 epitelijjskih 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. Delež regulatornih limfocitov v krvi je pogosto značilno zmanjšan pri avtoimunosti. Med njimi ločimo **Treg1** (Tr1 cells), ki nastanejo v timusu na avtoantigene. Po aktivaciji z antigenom močno izrazijo CD25 (CD25⁺⁺ limfociti T), ki je tudi njihov marker za določanje v krvi. **Celice Th3₂** so regulatorne celice, ki nastanejo na periferiji po aktivaciji na APC, njihov marker je citoplazemski marker TGF- β (celice T - TGF β ⁺).

Poleg razvojnih/diferenciacijskih 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, ki imajo namesto običajnega tipa T celičnega receptorja (TCRalfa/beta) drug tip receptorja (TCRgama/delta). Ta receptor ima manjšo raznolikost za prepoznavanje tujkov (antigenov), vendar pa lahko antigene prepozna neposredno (podobno kot protitelesa) in ne potrebuje predstavljanja preko APC. Alfa/beta DNT se pojavijo zlasti pri starostnikih in verjetno pomenijo nadomeščanje 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 – na primer pri avtoimunskih boleznih ali avtovnetnih boleznih (tipično pri ALPS-u, avtoimunskem limfoproliferativnem sindromu). 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-gama 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⁻).

Postopek

Gre za set posameznih preiskav. Izvedemo sledeče preiskave:

Limfocitne populacije

Limfociti T - Naivne in spominske celice T pomagalk

Limfociti T - Celice RTE - Recent Tymphic Emigrants

Limfociti T - Celice TCR α / β in TCR γ / δ DNT

Limfociti T - Celice Th1/Th2/Th17

Limfociti T – Regulatorni Treg1 (CD25⁺⁺)

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 preklap.

Hiper IgM sindrom se kaže v normalnem ali povečanem titru protiteles IgM in zmanjšanem titru protiteles IgG in/ali IgA. Ljudje s hiper IgM sindromom imajo defekte v izotipskem preklopu, ki vodi v znižano koncentracijo polno preklopljenih

spominskih celic B. Verjetna je povečana koncentracija nepreklopljenih spominskih celic B in zgoj IgM pozitivnih spominskih celic.

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 monocitov (mononuklearnih celic - PBMC)

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

Testi:

Aktivacija *in vitro* in določitev ekspresije aktivacijskih markerjev (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- γ , IL-10, IL-12, IL-6, IL-8, , TNF- α , in drugi)

Limfociti – blastno preoblikovanje

TLR testiranje (v pripravi!) – 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

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 - kri (EDTA) ali 2ml plazme

Testi:

Osnovno testiranje:

Klasična pot - CH50

Alternativna pot - APH50

C3d/dg

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

C3

C4

C1 inhibitor

C1q

C2

C5

C6

C7

C8

C9

C3 nefritični faktor

Faktor B, H, I

Properdin

C1 inh – aktivnost

Litični kompleks SC5b-9

Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

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 (napr. 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, nadaljna 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 primeri, 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 zvedo 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.

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)

Vzorec: 3ml epruveta – kri (heparin) + 3ml epruveta – kri (EDTA)

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 bistvene 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 nadaljna diagnostika s testom LAD.

Kongenitalne nevtropenije - Ciklična nevtropenija in Kostmannov sindrom

Bolezen 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 $200 \text{ celic na mm}^3$.

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 $500 \text{ celic na mm}^3$. 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 β podenoto vseh β -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.^{3,7} Diagnostični test za odkrivanje LAD tip 1 je pretočna citometrija, s katero ugotavljamo prisotnost CD18 na površini nestimuliranih in s PMA (phorbol mipyristat 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 α -podenote citokroma b₅₅₈ (phox-91). Mutacije ostalih podenot NADPH-oksidade se deduje avtosomno recesivno. Nefunkcionalna NADPH oksidaze ni sposobna reducirati molekulskega 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 epitelijskih 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.¹⁰ V klinični sliki pogosto najdemo limfadenitis, kožne abscese, pljučnice, hepatomegalijo in črevesne simptome podobne kot pri Crohnovi bolezni.¹¹

Okvara mieloperoksidaze

Kongenitalne okvare 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 *Candido* sp.

Motnja v osi interferon- γ -interlevkin-12

Os interferon- γ -interlevkin-12 je bistvena pri obrambi pred znotrajceličnimi mikrobi kot so mikobakterije, salmonelle in listerie. Fenotipsko se bolezen najhuje izrazi pri popolnem pomanjkanju INF- γ 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. avum*, *M. bovis*, *M. fortuitum*).

Testiranje pokazateljev vnetja (nespecifičnega, septičnega, alergijskega)

Koncentracija CRP v serumu

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

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

Testi:

CRP

Zgodnja detekcija septičnega vnetja

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

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

Testi

Sepsa CD64 test

Zaznavanje alergijskega vnetja

Testi:

Triptaza (aktivacija mastocitov)

ECP (eozinofilni kationski protein) (aktivacija eozinofilcev)

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, endoteljskih 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, levkocitza in produkcija proteinov akutne faze vnetja (PAF). Citokini IL1 β , 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 komplementa. 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×. 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 komplementa 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.

CD64 molekule na nevtrofilcih so zelo specifičen pokazatelj začetka obsežnejše bakterijske okužbe - sepse. CD64 se skoraj ne izraža na nevtrofilcih zdravega človeka, izražanje pa se močno poveča že 4 do 6 ur po bakterijski okužbi, poleg tega pa je izražanje CD64 stabilno še 72 ur po odvzetju krvi. Molekule CD64 na nevtrofilcih se v povečani meri izražajo pretežno le ob bakterijskih okužbah, mnogo manj pa v primeru tkivnih poškodb - zato je test primeren (skupaj s CRP) za razločevanje sepse od SIRSa.

Alergijsko vnetje: Najpogostejše alergijske bolezni so posredovane z IgE, kar pomeni, da pri alergijski reakciji sodelujejo aktivirani mastociti in bazofilci ter njihovi izločki. Ti sprožijo alergijsko vnetje in ga z aktivacijo drugih vnetnih celic, predvsem eozinofilcev in izločanjem novih mediatorjev še ojačijo 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 koncentracije citokinov in topnih receptorjev

Določevanje koncentracije citokinov in topnih citokinskih receptorjev z metodo ELISA.

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

Vzorec: Kri z EDTA ali kri brez antikoagulantov ali plazma ali serum ali supernatanti celičnih kultur ali druge telesne tekočine po dogovoru

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

Testi:

Citokini – vnetni

TNF α

IL-1 β *

IL-6

IL-8

IL-12

IFN- γ

*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- γ (Th1)

IL-4* (Th2)

IL-5 (Th2)

IL-10 (regulatorni)

TGF β 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 imunske pogojenih bolezni

Vzorec: 3 ml epruveta – serum

Testi:

Nabor citokinov: IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF, IFN- γ

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)

Vzorec: 3 ml epruveta – serum

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.

Paraneoplastična protitelesa

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 komplemента 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

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 sensorimotorične nevropatije, ALS, GBS)

Anti-GD1b (IgG in/ali IgM)
(Motorične in sensorimotorične nevropatije, ALS, GBS)

Anti-GQ1b (IgG in/ali IgM)
(Motorične in sensorimotorične nevropatije, Miller-Fisherjev sindrom (MFS), GBS oftalamoplegija)

Protitelesa anti-MAG (protitelesa proti z mielinom vezanimmi glikoproteini)

Indikacije: Sensorimotorične aksonske ali demielinizacijske polnevropatije, posebej v povezavi s paraproteinemijami, multipla skleroza (MS)

Vzorec: 3 ml epruveta – serum

Testi:

anti-MAG

Testiranje navzočnosti nevtralizacijskih protiteles proti terapevtikom

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 (ImmunoCAP 100)

Specifični IgE proti sezonskim inhalacijskim alergenom - pelodu

Indikacije: Sezonski alergijski rinitis (seneni nahod)

Vzorec: 3 – 5 ml venske krvi brez antikoagulatnov (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 alergogen, 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 alergena	Naziv alergena
	Pelodi trav
g3	<i>Dactylis glomerata</i> - pasja trava
g6	<i>Phleum pratense</i> - travniški mačji rep
g8	<i>Poa pratensis</i> - travniška latovka
g16	<i>Alopecurus pratensis</i> - travniški lisičji rep
g12	<i>Secale cereale</i> - rž
	Pelodi plevelov (zeli brez trav)
w1	<i>Ambrosia elatior</i> - pelinolistna žvrklja (ambrozija)
w6	<i>Artemisia vulgaris</i> - navadni pelin
w7	<i>Leucanthemum ircutianu</i> - navadna ivanjščica
w8	<i>Taraxacum officinale</i> - navadni regrat
w9	<i>Plantago lanceolata</i> - ozkolistni trpotec
w20	<i>Urtica dioica</i> - velika kopriva
w19	<i>Parietaria officinalis</i> - navadna krišina
	Pelodi dreves
t2	<i>Alnus incana</i> - siva jelša
t3	<i>Betula verrucosa</i> - navadna breza
t4	<i>Corylus avellana</i> - navadna leska
t9	<i>Olea europaea</i> - divja oljka
t12	<i>Salix caprea</i> - iva (vrsta vrbe)
t14	<i>Populus deltoides</i> - ameriški črni topol
t15	<i>Fraxinus American</i> - ameriški jesen

t19	<i>Acacia longifolia</i> - dolgolistna akacija
t23	<i>Cupressus sempervirens</i> - vednozelena cipresa
t203	<i>Aesculus hippocastanum</i> - navadni divji kostanj (okrasni kostanj)
t205	<i>Sambucus nigra</i> - črni bezeg
t208	<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 antikoagulatnov (seumski 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 moku, 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 žleznih 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 seznilizirajo na pokožnice in proteine živali, ki jih gojijo.

Testi: specifični IgE proti navedenim alergenom

	Pršice
d1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> - hišni kožojed (hišna pršica)
d2	<i>Dermatophagoides farinae</i> - moknati kožojed (hišna pršica)
	Mikroorganizmi
m1	<i>Penicillium notatum</i>
m2	<i>Cladosporium herbarum</i>
m3	<i>Aspergillus fumigatus</i>
m4	<i>Mucor racemosus</i>
m5	<i>Candida albicans</i>
m6	<i>Alternaria alternata</i>
m207	<i>Aspergillus niger</i>
m223	Stafilokokni enterotoksin C*
m224	Stafilokokni enterotoksin D*
m226	Stafilokokni enterotoksin TSST*
m227	<i>Malassezia spp.</i>
Gm22	<i>Micropolyspora faeni</i>
Gm23	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
Gmx6	Mešanica plesni 6 (<i>Penicillium notatum</i> / m1; <i>Cladosporium herbarum</i> /Gm2; <i>Mucor racemosus</i> /m4; <i>Alternaria alternata</i> /Gm6)
Gmx7	Mešanica plesni in bakterij 7 (<i>Micropolyspora faeni</i> /Gm22; <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> /Gm23)

*ni inhalacijski alergen

	Pokožnice (epidermisi) in živalski proteini
Ge91	Golob - serumski proteini, perje, iztrebki
e70	Gos - perje
e201	Kanarček - perje
e3	Konj - prhljaj
e80	Koza - epitelij
e4	Krava - prhljaj
e82	Kunec - epitelij
e85	Kura, piščanec - perje
e1	Mačka - epitelij in prhljaj
e81	Ovca - epitelij
e213	Papiga - perje
Ge92	Papiga - serumski proteini, perje, iztrebki
e78	Papiga skobčevka - perje
e2	Pes - epitelij
e5	Pes - prhljaj
e87	Podgana - epitelij, serumski proteini, proteini iz urina
e83	Prašič - epitelij
e89	Puran - perje
e86	Raca - perje
ex1	Živalski prhljaj (mačka - epitelij in prhljaj/e1; konj - prhljaj/e3; krava - prhljaj/e4; pes - prhljaj/e5)
ex71	Mešanica perja (gos - perje/e70; kura, piščanec - perje/e85; raca - perje/e86; puran - perje/e89)
ex72	Mešanica perja (papiga skobčevka - perje/e78; papiga - perje/e213; kanarček - perje/e201; ščinkavec - perje/e214)

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 bolezenskih 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 izzzveni 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 dopoljenih treh mesecih starosti, v 80 odstotkih pa do dopoljenega 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

	Hrana - sadje in zelenjava
f48	Čebula
f47	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
	Hrana - semena, stročnice in oreški
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

	Hrana - začimbe
f86	Peteršilj
	Hrana - ribe, raki in mehkužci
f258	Ligenj
f24	Rakci (kozice)
f307	Ribe (oslič)
f206	Ribe (skuša)
f3	Ribe (trska/polenovka)
f40	Ribe (tuna)
f37	Školjke (užitna klapavica)
	Hrana - jajca in perutnina
f1	Jajčni beljak
f75	Jajčni rumenjak
f83	Kurje (piščančje) meso
f284	Puranje meso
	Hrana - meso
f27	Govedo
f88	Ovca, jagnje
f26	Prašič
	Hrana - mleko
f2 #	Kravje mleko
f77	Laktoglobulin beta
f78	Kazein
	Hrana - razno
F324	Hmelj - <i>Humulus lupulus</i> (storžek)
f93	Kakav
f212	Šampinjoni, gojeni

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

Testi: specifični IgE proti navedenim alergenom

	Žuželke
i71	Navadni komar
	Strupi kožekrilcev
i1	Domača čebela
i3	Osa
i75	Sršen
	Zdravila

c1	Peniciloil G
c2	Peniciloil V
c5	Ampiciloil
c6	Amoksiciloil
c7	Cefaklor
c70	Inzulin – svinjski
c73	Inzulin – humani
c74	Goveja želatina
Rc208	Tetanusni toksoid
	Poklicni alergeni
k70	Nepražena kavna zrna
k73	Odpadki pri izdelavi svile
k83	Seme bombaževca
k78	Etilenoksid
k80	Formaldehid (Formalin)
k82	Lateks
k87	Alfa-amilaza
pax 5	Izocianati (TDI , MDI, HDI)
pax 6	PAX 6 (etilenoksid/k78; ftalični anhidrid/k79; formaldehid/k80; kloramin T/k85)
	Paraziti
p1	Ascaris – askaris
p2	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 (seumski 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</i> / m1; <i>Cladosporium herbarum</i> /Gm2; <i>Mucor racemosus</i> /m4; <i>Alternaria alternata</i> /Gm6)	Gmx6
Mešanica plesni in bakterij 7 (<i>Micropolyspora faeni</i> /Gm22; <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> /Gm23)	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; puran - perje/e89)	ex71
Mešanica perja (papiga skobčevka - perje/e78; papiga - perje/e213; kanarček - perje/e201; ščinkavec - perje/e214)	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

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.

V krvi preiskovancev, za katere obstaja sum na preobčutljivost za določene alergene, se meri izražanje CD63 na površini bazofilcev ob stimulaciji s posameznimi alergeni. BAT je dopolnilna metoda za ugotavljanje alergijskih reakcij in je najmanj enako specifična kot določanje specifičnih protiteles IgE oz. kožni vbodni testi.

1 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 ≥ 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) 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 annexin V, ki močno in specifično reagira s fosfatidilserinom v prisotnosti kalcija. Apoptotične celice označene z konjugiranim annexinom 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 annexinom 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.

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:

Elektrostatskegi potencial mitohondrijev z DiOC6 - apoptoza

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 kaspase 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 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) ze zmanjša količina vezanega barvila in s tam tudi celična fluorescenca.

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 ev. 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

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)

Indikacije: Opredelitev posameznikov, ki so nosilci molekul HLA B-27, ki so povezane z nastankom nekaterih revmatskih bolezni, zlasti ankilizirajočega spondilitisa.

Vzorec: 3 ml epruveta – kri (EDTA)

Test:

HLA B27

Principi diagnostike in interpretacije rezultatov

Levkocitne antigene HLA B27 na površini limfocitov označimo s monoklonskimi protitelesi anti HLA B-27, ki so označeni s fluorokromi. V 0,2 ml preiskovančeve krvi kanemo monoklonska protitelesa proti HLA- B27 molekulam. Po 20 minutni inkubaciji ugotovimo z metodo pretočne citometrije, da 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). Določanje s pretočnim citometrom je v osnovi enaka metodi fluorescenčne mikroskopije, s to razliko, da je odčitavanje odstotka obarvanih celic avtomatizirano, hitrejše in objektivnejše. Za analizo s pretočnim citometrom potrebujemo celice v suspenziji.

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, γ -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 (igand) kot potencialna negativna povratna zanka za aktivacijo limfocitov v določenih tkivih (napr. očesno zrklo) ali fizioloških stanjih (daljše vnetje, infekcija). Klinične posledice nezavrte uravnave limfocitne proliferacije: **Nemaligna limfoprolifracija** (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 trombotopenija, 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 (prolifracija) 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 pro-vnetnih citokinov limfocitov Th, povečano se tudi koncentracija Th, zmanjšana pa je koncentracija Treg (CD3 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 α , IL-6, 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, Povečana koncentracija interferona gama, Povečana koncentracija TNF alfa, Povečana koncentracija IL-1, Povečana koncentracija IL-6, Povečana koncentracija IL-18, Povečana koncentracija FasL; Celice v krvi:

Zmanjšana koncentracija celic NK, Zmanjšana 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 (1/25 000), ki se kaže s pogostimi pljučnicami, prebavnimi motnjami in povečano nagnjenostjo za razvoj avtoimunskih bolezni. Klinične težave se začnejo bodisi v zgodnjem otroštvu, ali med 15 in 40 leti 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 pojavnne oblike bolezni (točneje: skupine različnih bolezni) različne. Bolniki imajo zmanjšane krvne koncentracije protiteles, limfocitov B in včasih tudi celic T pomagalk, obenem pa pogosto povečano krvno koncentracijo citotoksičnih limfocitov T (CD8). Pogosto je tudi zmanjšano razmerje celic CD4/CD8 in zmanjšana koncentracija naivnih (CD45RA) celic T pomagalk. Defekt pri CVID je največkrat vezan na defekt MHC, IgA, IgD, ICOS (inducibilni kostimulator limfocitov T). 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 preklop. 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 protočne citometrije: 1. Zmanjšana koncentracija izotipsko preklopljenih IgM(-)IgD(-) spominskih (CD27+) limfocitov B CD27(+)IgM(-)IgD(-) (več kot 0,5% 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