

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAGISTRSKA NALOGA

ANTON KROFLIČ

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ANTON KROFLIČ

**VREDNOTENJE PREVALENCE POMANJKANJA PROTITELES RAZREDA IgA
MED SLOVENSKIMI KRVODAJALCI**

**EVALUATION THE PREVALENCE OF IgA ANTIBODY DEFICIENCY AMONG
SLOVENE BLOOD DONORS**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem v celoti izdelal na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jeras, mag. farm. in somentorice Vesne Hrašovec, dr. med., spec. transf. med.

Najprej bi se rad zahvalil mentorju, izred. prof. dr. Matjažu Jerasu, mag. farm., za nasvete pri izdelavi naloge. Hvala tudi somentorici Vesni Hrašovec, dr. med., spec. transf. med, za pomoč pri nastajanju tega dela. Prav tako se zahvaljujem svojim sodelavkam za nesebično pomoč pri praktičnem izvajanju naloge.

Iskreno se zahvaljujem svojim staršem, bratu Janezu in prijateljem, ki so me med celotnim študijem vzpodbujali in mi vedno znali modro svetovati.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo smostojno izdelal pod mentorstvom mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorstvom Vesne Hrašovec, dr. med., spec. transf. med.

Ljubljana, 2016

Anton Kroflič

Predsednica komisije: Prof.dr. Marija Sollner Dolenc

Somentorica: Vesna Hrašovec, dr. med., spec. transf. med.

Član komisije: doc. dr. Igor Locatelli, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1. UVOD	1
1.1 Protitelesa	1
1.1.1 Zgradba protiteles razreda IgA in njihovih izotipov	2
1.1.3 Funkcijske lastnosti protiteles razreda IgA	2
1.2 Imunske pomankljivosti	3
1.2.1 Primarno selektivno pomankanje sekrecijskih protiteles IgA (s-IgAD) in njegova 3 epidemiologija	3
1.2.2 Patofiziologija in genetika s-IgAD	3
1.2.3 Klinični znaki pomankljivosti s-IgAD	4
1.3 Transfuzijske reakcije	6
1.3.4 Protitelesa proti IgA	7
1.3.5 Pogostost alergijskih transfuzijskih reakcij pri osebah s pomankanjem protiteles razreda IgA	7
1.3 Krvni pripravki, primerni za uporabo pri pacientih s pomankanjem protiteles razreda IgA	7
1.4.1 Priporočila Sveta Evrope glede priprave krvnih komponent	8
1.5 Metode za določanje protiteles IgA	8
1.6 Metode za določanje protiteles proti IgA	10
1.7 Vrednotenje analiznih metod in rezultatov	11
2. NAMEN DELA	13
3 MATERIAL IN METODE	14
3.1 Materiali	14
3.1.1 Vzorci	14
3.1.2 Kemikalije in reagenti	14
3.2 Metode	15
3.2.1 Testa ID PaGIA IgA Deficiency in ID PaGIA Anti-IgA Antibody	15
4. REZULATI	21

4.1	Rezultati testa ID PaGIA IgA Deficiency	21
4.2.1	Rezultati testa ID PaGIA Anti-IgA Antibody	25
5	RAZPRAVA	28
6	ZAKLJUČKI	31
7	LITERATURA	32

POVZETEK

Najpogostejša oblika imunske pomanjkljivosti med krvodajalci v zahodnem svetu je pomanjkanje protiteles razreda IgA. Njena prevalenca je med 1:406 in 1:886. Znano je tudi, da imajo lahko bolniki s hudo pomanjkljivostjo IgA, ki imajo protitelesa proti IgA, hude zaplete po transfuziji krvnih komponent, ki seveda vsebujejo IgA. Zato moramo dobro poznati njihov protitelesni status.

Pri ugotavljanju prevalence pomanjkanja protiteles razreda IgA med slovenskimi krvodajalci smo primerjalno vrednotili komercialno dostopna testa proizvajalca BIO-RAD, in sicer prvega za določanje IgA (ID PaGIA Deficiency Test) in drugega za ugotavljanje prisotnosti protiteles proti IgA (ID PaGIA Anti-IgA Antibody Test). Validacijo uporabljenih metod smo izvedli v dveh sklopih. V okviru prvega smo poleg presejalnega testiranja vzorcev krvodajalcev z uporabo robota Techno Twin Station (Diamed Bio-Rad) in ID PaGIA IgA Deficiency Test-om, vzporedno primerjalno vrednotili tudi test sendvič ELISA za določanje serumskih koncentracij protiteles IgA, ki so ga razvili v Centru za razvoj in izdelavo diagnostičnih reagentov (CRIDR) na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM). V drugem sklopu pa smo nato tiste vzorce krvodajalcev, v katerih smo predhodno dokazali pomanjkanje protiteles razreda IgA, primerjalno testirali z uporabo ID PaGIA Anti-IgA Antibody Test-om ter testa ELISA, ki so ga prav tako razvili v CRIDR. Med 4.626 testiranimi krvnimi vzorci slovenskih krvodajalcev smo jih odkrili 9, s pomanjkanjem protiteles razreda IgA. Med temi pa so le 4 (44 %) v plazmi vsebovali specifična protitelesa proti IgA. Pogostnost pomanjkanja IgA med slovenskimi krvodajalci je tako 1:514 (0,19 %), kar potrjuje predhodno objavljive izsledke za krvodajalce v Evropi in drugod v zahodnem svetu.

Ugotovili smo, da je ID PaGIA IgA Deficiency Test ustrezna metoda za presejalno testiranje in vzpostavitev registra krvodajalcev s pomanjkanjem protiteles razreda IgA. Tudi uporaba sestava ID PaGIA Anti-IgA Antibody Test se je izkazala kot zelo primerna za ugotavljanje prisotnosti specifičnih protiteles proti IgA pri osebah s pomanjkanjem IgA.

Rezultati magistrske naloge omogočajo začetek oblikovanja ter nadaljnega dopolnjevanja in vzdrževanja registra krvodajalcev s pomanjkanjem protiteles razreda IgA v Republiki Sloveniji.

Ključne besede: protitelesa IgA, protitelesa proti IgA, Encimskoimunski test (ELISA), gelska kartica, imunske pomanjkljivosti, transfuzija krvnih pripravkov

ABSTRACT

IgA antibody deficiency is the most frequent immunodeficiency among blood donors in the Western World. Its incidence is between 1:406 to 1:886. It is also known that patients with severe IgA deficiency, who developed antibodies against IgA, experience significant complications following transfusion of blood components containing normal amounts of IgA. Therefore, it is essential to know the antibody status of both, patients and blood donors.

For determining the prevalence of IgA antibody deficiency among Slovene blood donors, we carried out a comparative validation of two commercially available BIO-RAD tests: the first one for determining the levels of IgA antibodies (ID PaGIA Deficiency Test) and the second for detecting the presence of antibodies against IgA (ID PaGIA Anti-IgA Antibody Test). The validation of the two tests was carried out in two stages. During the first one we did not only screen blood samples of donors by using the ID PaGIA IgA Deficiency Test on the Techno Twin Station robot (Diamed Bio-Rad), but also participated in a parallel comparative assessment of an ELISA sandwich test for determining serum concentrations of IgA antibodies, developed by the Centre for the Development and Production of Diagnostic Reagents (CRIDR) at the Blood Transfusion Centre of Slovenia (BTC). In the next stage, we took all blood-donor samples, which had a proven IgA antibody deficiency, and comparatively tested them, using the commercially-available ID PaGIA Anti-IgA Antibody Test and the two in-house ELISA assays, being also developed by the CRIDR. Among the total of 4.626 tested blood samples of Slovene blood donors, we found 9 with IgA antibody deficiency. Only 4 of them (44%) contained specific antibodies against IgA. The incidence of IgA deficiency among Slovene blood donors is thus 1:514 (0.19%), confirming previously published results for blood donors in Europe and the rest of the Western World.

We established that the ID PaGIA IgA Deficiency Test is an adequate method for screening and setting up a registry of blood donors with IgA antibody deficiency. The ID PaGIA Anti-IgA Antibody Test has also proven to be an appropriate method for determining the presence of specific IgA antibodies in people with IgA deficiency.

The results of our Master's Thesis represent a basis for forming, expanding and maintaining a registry of blood donors with IgA deficiency in Slovenia.

Key words: IgA antibodies, antibodies against IgA, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), gel card, immunodeficiencies, blood component transfusion

SEZNAM OKRAJŠAV

ADCC	s protitelesi posredovana citotoksičnost (ang. Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity).
Ag	antigen
BTC	Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ang. Blood Transfusion Centre of Slovenia)
CDR	variabilna področja (ang. Complementarity Determining Regions)
ELISA	encimskoimunski test (ang. Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
Gal	galaktoza
GalNAc	N - acetil galaktozamin
GlcNAc	N-acetil glukozamin
HLA	človeški levkocitni antigeni (ang. Human Leukocyte Antigen)
Ig	imunoglobulini
IgA	imunoglobulin A
IgD	imunoglobulin D
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL	interlevkin
KEF	koncentrirani filtrirani eritrociti
KEO	koncentrirani eritrociti v ohranitveni raztopini
NeuNAc	N-acetil nevraminska oz. sialna kislina
MHC	poglavitni kompleks tkivne skladnosti (ang. Major Histocompatibility Complex)
PaGIA	tehnika delec-gelskega imunskega testa (angl. Particle-gel Immunoassay Technique)
PID	inhibicija Primarna pomanjkljivost (ang. Primary Immunodeficiency Diseases)
PHAI	inhibicija pasivne hemaglutinacije (ang. Passive Haemagglutination Inhibition)
RA	revmatoidni artritis

RIA	radioimunski test (ang. Radio Immune Assay)
RID	radialna imunodifuzija (ang. Radial Immunodiffusion)
SAG-M	ohranitvena tekočina (raztopina natrijevega klorida, adenina, glukoze in manitola)
SCID	huda kombinirana imunska pomankljivost (ang. Severe Combined Immunodeficiency)
SPRCA	adherenca rdečih krvničk na trdno fazo (ang. Solid Phase Red Cell Adherence)
s-IgAD	primarno selektivno pomankanje IgA
SLE	sistemski lupus eritematozus
SV	sekrecijska veriga
TACO	s transfuzijo povezana preobremenitev krvnega obtoka (ang. Transfusion-Associated Circulatory Overload)
TGF- β	transformajoči rastni dejavnik β (ang. Transforming Growth Factor beta)
TR	transfuzijske reakcije
TRALI	s transfuzijo povezana akutna okvara pljuč (ang. Transfusion-Related Acute Lung Injury)

SEZNAM SLIK IN PREGLEDNIC

Seznam slik

<i>Slika 1: Osnovna struktura molekule protiteles.....</i>	<i>1</i>
<i>Slika 2: Princip testa ID PaGIA IgA Deficiency</i>	<i>15</i>
<i>Slika 3: Princip metode ID PaGIA Anti-IgA Antibody Test.....</i>	<i>16</i>
<i>Slika 4: Prikaz interpretacije rezultatov testov ID PaGIA IgA Deficiency in ID PaGIA Anti-IgA Antibody.....</i>	<i>17</i>
<i>Slika 5: Shematski prikaz postopka izvedbe testov ID PaGIA IgA Deficiency in ID PaGIA Anti-IgA Antibody.....</i>	<i>18</i>
<i>Slika 6: Robot Techno Twin Station</i>	<i>19</i>
<i>Slika 7: Primer prikaza rezultatov na Robotu Techno Twin Station (Diamed Bio-Rad).....</i>	<i>21</i>
<i>Slika 8: Porazdelitev ugotovljenih koncentracij protiteles razreda IgA glede na spol krvodajalcev.....</i>	<i>25</i>
<i>Slika 9: Ponovitve na Robotu Techno Twin Station pri lažno pozitivnih rezultatih.....</i>	<i>24</i>
<i>Slika 10: Ponovitve na Robotu Techno Twin Station pri lažno negativnih rezultatih</i>	<i>25</i>
<i>Slika 11: Rezultati ročnega testiranja z metodo ID PaGIA Anti-IgA Antibody Test.....</i>	<i>28</i>

Seznam preglednic

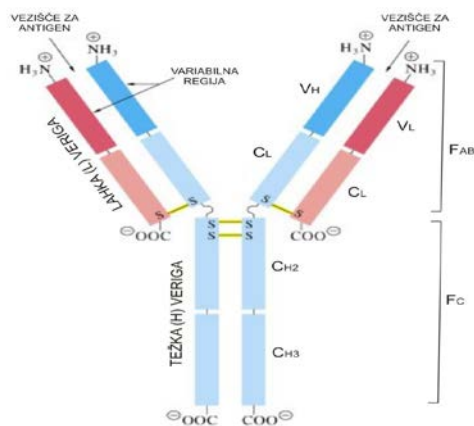
<i>Preglednica 1: Efektorske funkcije protiteles.....</i>	<i>2</i>
<i>Preglednica 2: Primerjava rezultatov izmerjenih s komercialno dostopnim testom ID PaGIA IgA Deficiency in testom sendvič ELISA, razvitim na ZTM.....</i>	<i>22</i>
<i>Preglednica 3: Rezultati prvega dela testiranja.....</i>	<i>23</i>
<i>Preglednica 4: Rezultati drugega dela testiranja.....</i>	<i>23</i>
<i>Preglednica 5: Rezultati obeh delov testiranja skupaj.....</i>	<i>24</i>
<i>Preglednica 6: Kontigenčna tabela za izvedbo Fisherjevega testa rezultatov določanja protiteles razreda IgA v plazemskih vzorcih 4.626 krvodajalcev.....</i>	<i>25</i>
<i>Preglednica 7: Primerjava rezultatov testiranja vzorcev s pomanjkanjem protiteles IgA med testoma ID-PaGIA Anti-IgA Antibody in ELISA.....</i>	<i>26</i>
<i>Preglednica 8: Preglednica 8: Rezultati primerjalnega testiranja vzorcev s koncentracijo protiteles IgA < 0,5 mg/L.....</i>	<i>27</i>
<i>Preglednica 9: Preglednica 9: Prikaz značilnosti vseh 9 vzorcev krvodajalcev s pomanjkanjem protiteles razreda IgA.....</i>	<i>27</i>

1. UVOD

Neokrnjeno delovanje imunskega sistema je nujno potrebno za učinkovito obrambo organizma pred patogenimi mikroorganizmi in drugimi škodljivimi dejavniki. Okvara ali nezadostnost ene ali več komponent imunskega sistema je lahko vzrok za hude ali celo usodne motnje, ki jih imenujemo imunske pomanjkljivosti. Te delimo na dve skupini, in sicer na primarne ali prirojene in sekundarne ali pridobljene (1).

1.1 Protitelesa

Protitelesa ali imunoglobulini so si med seboj strukturno in funkcijsko podobni glikoproteini, ki predstavljajo dejavnike humoralne imunosti pri sesalcih. Zgrajeni so iz po dveh lahkih in dveh težkih aminokislinskih verig, medsebojno povezanih s kovalentnimi disulfidnimi vezmi in hidrofobnimi interakcijami (Slika 1).



Slika1: Shematski prikaz osnovne strukture molekule protitelesa; povzeto po (21).

Za prepoznavo antigena in vezavo nanj so odgovorne aminokisliline v variabilnih področjih lahkih in težkih verig, imenovanih hipervariabilna področja (CDR). Približno 10 aminokislinskih ostankov, ki se nahajajo v zankah šestih CDR (3 v lahkih in 3 v težkih verigah), je na zgornji površini molekule protitelesa izpostavljenih tako, da so dostopni za interakcije z antigeni (Ag). Razlike v aminokislinskih zaporedjih v strukturnih področjih CDR med posameznimi razredi in kloni protiteles zagotavljajo antigensko specifičnost posameznega protitelesa, konstantni predeli Fc pa so odgovorni za ostale biološke oziroma efektorske funkcije (Preglednica 1).

Preglednica1: Efektorske funkcije protiteles; povzeto po (2).

Efektorske funkcije protiteles
- Nevtralizacija mikrobov in njihovih toksičnih proizvodov
- Aktivacija komplementa, ki vodi do lize mikrobov in okuženih celic ter sproščanja biološko aktivnih molekul.
- Opsonizacija patogenov ter pospeševanje fagocitoze in mikrobicidne aktivnosti fagocitov
- S protitelesi posredovana celična citotoksičnost (ADCC)
- Reakcije takojšnje preobčutljivosti in aktivacija mastocitov
- Encimska aktivnost

Na podlagi strukturnih razlik med konstantnimi področji težkih verig razlikujemo med petimi razredi protiteles, in sicer IgG, IgA, IgM, IgD in IgE, ki se med seboj ločijo še v valenci vezave na antigen, efektorskih funkcijah ter vsebnosti in mestih pripetih ogljikovih hidratov (2).

1.1.1 Zgradba protiteles razreda IgA in njihovih izotipov

Protitelesa IgA so sestavljena iz po dveh identičnih težkih verig α , ki sta povezani z dvema identičnima lahkima verigama tipa λ ali κ . Obstajajo v obliki dveh podrazredov, IgA1 in IgA2 (4). V serumu prevladuje monomerna oblika IgA1, v majhnem deležu pa so v njem prisotne tudi večmerne molekule protiteles IgA. Koncentracija obeh podrazredov je v telesnih izločkih enaka, čeprav je včasih veljalo, da v njih prevladuje podrazred IgA2. Najvišja koncentracija molekul IgA2, in sicer približno 35 %, je v materinem mleku, slini in solzah (4). Protitelesa razreda IgA so tudi najbolj glikozilirana med vsemi imunoglobulini (4).

1.1.3 Funkcijske lastnosti protiteles razreda IgA

Poglavitna funkcijska razlika med protitelesi IgA in ostalimi imunoglobulini, ki prevladujejo v krvi, torej IgG in IgM je v tem, da slednja aktivirajo vnetne dejavnike (predvsem komponente komplementa) in fagocitne celice, IgA pa nasprotno delujejo protivnetno. Osnovna funkcija protiteles IgA je namreč ta, da vežejo tuje molekule, ki so uspele prodreti skozi sluznico, in jih nato preko epitelijskih celic prenesejo nazaj na sluznično površino (3). Večina črevesnih patogenih bakterij in virusov se mora najprej tesno pripeti na epitelijske celice, da lahko delujejo patogeno, kar jim preprečujejo na sluznico pripete dimerne molekule IgA (5). Heremans je že leta 1960 ugotovil, da je IgA poglavitni imunoglobulin v mleku (1). Kmalu zatem pa so odkrili, da so tovrstna protitelesa v mleku prisotna v dimerni obliki (s-

IgA). Zelo pomembno je bilo tudi odkritje, da protitelesa IgA v mleku delujejo proti bakterijskim in virusnim antigenom, in sicer predvsem tistim, ki so navzoči v črevesju (1).

1.2 Imunske pomanjkljivosti

Bolezni, ki so posledica imunskih pomanjkljivosti so zelo heterogene, saj so pri njihovem nastanku udeleženi različni sestavni deli imunskega sistema. Imunske pomanjkljivosti lahko opredelimo glede na prizadete sisteme, in sicer na B-celične, T-celične, kombinirane T- in B-celične pomanjkljivosti, biokemične in presnovne pomanjkljivosti, proliferativne nepravilnosti limfocitov B in T, disfunkcije fagocitov in pomanjkljivosti komplementnega sistema.

Pomanjkljivo izdelovanje protiteles je posledica motenj oz. napak v razvoju in funkciji limfocitov B. Nezadostno ali prekomerno izdelovanje protiteles lahko povzročijo tudi nenormalne funkcije celic T pomagalk. Kombinirane imunske pomanjkljivosti so tiste primarne imunske pomanjkljivosti, ki prizadenejo tako limfocite T kot B. Takšne okvare so lahko popolne ali delne, bolezenska znamenja pa se pojavijo že zgodaj v otroštvu (6).

1.2.1 Primarno selektivno pomankanje sekrecijskih protiteles IgA (s-IgAD) in njegova epidemiologija

Do danes so identificirali že več kot 200 različnih vrst primarnih pomanjkljivosti (PID) in za številne med njimi določili genetske osnove. Najobičajnejša PID človeškega pridobljenega imunskega sistema je primarno selektivno pomankanje sekrecijskih protiteles IgA (s-IgAD).

Ocenjujejo, da s-IgAD prizadene približno 1 na 600 prebivalcev v zahodnem svetu. To pomeni, da lahko pričakujemo, da bo v skandinavskih državah imelo to obliko PID več kot 41.000 posameznikov, 835.000 v EU in 511.300 v ZDA. Obolenje je manj pogosto v Aziji, kjer so stopnje prevalence 1 / 2.600 - 4.800 ljudi različnih narodnosti na Kitajskem in 1 / 18.550 - 23.255 prebivalcev na Japonskem (7).

1.2.2 Patofiziologija in genetika s-IgAD

Pomankanje sekrecijskih protiteles IgA (S-IgAD) je najverjetneje heterogena motnja, ki temelji na različnih patogenih mehanizmih. Predvidevajo, da nastane zaradi okvare na nivoju matične celice, kar temelji na poročilih o prenosu bolezni pri presaditvah kostnega mozga med posamezniki z s-IgAD in zdravimi osebami. O molekulskih osnovah, ki so vzrok za s-IgAD vemo malo, genska okvara pa je najbrž regulacijske narave in vključuje bodisi neustrezno preklapljanje razredov protiteles ali pa okvare na nivojih transkripcije ali post-transkripcije (7).

1.2.3 Klinični znaki pomanjkljivosti s-IgAD

Leta 1964 so prvič opazili pomanjkljivosti IgA, in sicer pri dveh zdravih moških, zato so domnevali da IgA ni bistven za ustrezno imunsko funkcijo. Nekaj let pozneje, ko so pregledali 30 oseb z s-IgAD, pa so ugotovili, da je to patološko stanje verjetno povezano s ponavljajočimi se, najpogosteje blagimi do zmerno hudimi respiratornimi okužbami, avtoimunskimi boleznimi, alergijo in astmo. Klinična pomembnost s-IgAD še vedno ni popolnoma pojasnjena, večinoma zaradi neuporabe ustreznih naključno izbranih kontrolnih skupin, nezadostnega števila nadaljevalnih študij in/ali odklonov pri izbiri prizadetih posameznikov za nadaljnje preučevanje (7).

1.2.3.1 S-IgAD in okužbe

Pri posameznikih z s-IgAD najpogosteje opazijo respiratorne okužbe. V študiji, v okviru katere so preučevali 159, na začetku zdravih krvodajalcev z s-IgAD, ki so jih nato spremljali 20 let in jih ves čas primerjali z 237 krvodajalci iste starosti in spola, z normalnimi vrednostmi IgA, so ugotovili njihovo bistveno povečano dovzetnost za pojav pljučnic in ponavljajočih se respiratornih okužb. Tako je imelo 26 % posameznikov z s-IgAD hude akutne, 16 % pa ponavljajoče se virusne respiratorne okužbe, in sicer v primerjavi z le 8 % oz. 1 % zdravih oseb v kontrolni skupini (7). Druga študija pa je pokazala, da so ponavljajoče se okužbe, zlasti sinusov in pljuč, ki so terjale medicinsko posredovanje, prizadele kar 73 % oseb z s-IgAD, vendar 95 % od teh šele proti koncu opazovalnega obdobja (7).

1.2.3.2 S-IgAD in alergije

Odkar preiskujejo to bolezen, so pri posameznikih z s-IgAD opazili njihovo povečano nagnjenost k alergijam. Tako so leta 1969 poročali, da je bilo med 24 odraslimi z s-IgAD, kar 14 (58 %) takih z diagnosticiranimi atopičnimi boleznimi. V novejših študijah pa niso uspeli vedno dokazati, da so alergijske bolezni pogostejše med posamezniki z s-IgAD, saj so v nekaterih od njih ugotovili visoko prevalenco alergijskih bolezni (32-84 %), medtem ko je bila ta v drugih podobna tisti v kontrolnih skupinah oz. pričakovanim vrednostim znotraj normalne populacije (7). Nedavno so izvedli študijo na 14 švedskih otrocih z s-IgAD, ki so bili vsi stari 4 leta in so jih v raziskavo vključili na podlagi presejalnega testa, izvedenega že ob njihovem rojstvu. Primerjali so jih z 2.409 otroki enake starosti, a z normalnimi nivoji IgA in ugotovili bistveno večje tveganje tovrstnih bolnikov za preobčutljivost na hrano, glede na kontrolno skupino (33 % proti 12 %) (7).

1.2.3.3 S-IgAD in avtoimunske bolezni

Ocenjujejo, da je kombinirana prevalenca avtoimunskih bolezni v zahodnem svetu okoli 3 – 5 %, pri posameznikih z s-IgAD pa med 7 in 36 %, odvisno od preučevane kohorte (7). Po 20-letnem spremljanju 159 posameznikov z s-IgAD, ki so jih odkrili med presejanjem zdravih krvodajalcev, so ugotovili, da jih je 36 (23 %) razvilo avtoimunske bolezni (7). Prvotno so s-IgAD povezovali samo s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi, saj so o visoki prevalenci pomanjkanje IgA poročali pri bolnikih s sistemskim lupusom eritematosusom (SLE) in revmatoidnim artritismom (RA) (7). V nedavnem poročilu o 3.388 bolnikih z SLE iz štirih držav, so zapisali, da so pri 1,3 % (1/77) odkrili s-IgAD (7). V okviru več manjših študij so opozorili tudi na povezavo med Gravesovo boleznijo in s-IgAD, čeprav tega v nekaterih drugih raziskavah niso potrdili (7). Tudi diabetes tipa 1 pogosto povezujejo z s-IgAD (7). Ostale organsko specifične avtoimunske bolezni, ki jih pogosto omenjajo kombinaciji z s-IgAD, pa so še: celiakija, miastenia gravis, psoriza, idiopatska trombocitopenična purpura (ITP) in vitiligo (6).

1.2.3.4 S-IgAD in rak

Precej časa je vladalo mnenje, da je s-IgAD povezan z večjim tveganjem za rakava, še zlasti gastrointestinalna in limfoproliferativna maligna obolenja. V obširni študiji so 386 švedskih in danskih posameznikov z s-IgAD, na osnovi podatkov iz registra rakavih obolenj, primerjali s prevalenco raka v splošni populaciji. Ugotovili so, da splošna pojavnost raka v tej skupini bolnikov ni bila statistično značilno povečana, čeprav so pri njih zabeležili neznačilno večje tveganje za raka na želodcu (7). Med 10-letnim spremljanjem 63 otrok z s-IgAD, so pri 3 (4,8 %) diagnosticirali maligna obolenja, in sicer pri enem astrocitom in adenokarcinom kolona, pri drugem Hodgkinov limfom, pri tretjem pa nevroblastom (7).

1.2.3.5 S-IgAD in zobno zdravje

Posamezniki s pomanjkanjem IgA imajo tudi premalo s-IgA v slini, zato menijo, da so bolj podvrženi zobnim in periodontalnim boleznim. V študiji, s katero so raziskovali ustno in zobno stanje pri otrocih z s-IgAD, so opazili bistveno hujše oblike zobnega kariesa kot v kontrolnih skupinah, vendar pa to velja le za mlečne zobe (7). Za spremljanje razvoja kariesa stalnih zob bi bilo seveda potrebno daljše obdobje. Pri preučevanju periodontalnega zdravja odraslih oseb z s-IgAD pa sicer do sedaj še niso poročali o bistvenih razlikah, v primerjavi s kontrolnimi skupinami (7).

1.2.3.6 S IgAD in z zdravjem povezana kakovost življenja

Z zdravjem povezana kakovost življenja (HRQL) vključuje posameznikova subjektivna zaznavanja lastnega blagostanja in delovanja v fizičnem, čustvenem, socialnem in mentalnem segmentu vsakdanjega življenja, in sicer v smislu zdravja, kot ga pač posameznik dojema. Potencialni klinični pomen preučevanja HRQL pri osebah z s-IgAD so izpostavili že pred dvema desetletjema. Vedenje o HRQL je namreč lahko dobra osnova za morebitne klinične intervencije. Kljub temu, da je s-IgAD najpogostejša humoralna PID pri ljudeh, pa so na tem področju do sedaj izvedli le eno študijo glede HRQL. Vanje so vključili 55 bolnikov z različnimi PID, in sicer s CVID, Brutonovo agamaglobulinemijo, s-IgAD in sindromom pri hiper IgM. Od teh jih je le 8 imelo s-IgAD (7). Zato je na tej osnovi težko narediti zaključke glede HRQL pri posameznikih z s-IgAD. Ugotovili pa so, da so se posamezniki z s-IgAD ob upoštevanju HRQL uvrstili višje na družbeno-ekonomskem, družinskem in duševnem področju (7).

1.3 Transfuzijske reakcije

V skladu z nacionalnimi smernicami, je transfuzijska reakcija definirana kot »neželen in nenameravan pojav med dajanjem ali po dajanju katerekoli komponente/pripravka krvi, za katerega menimo, da je povezan z omenjenim pripravkom«. Čeprav so transfuzije krvi na splošno varne, saj so krvne komponente pridobljene iz polne krvi z ustreznimi, skrbno predpisanimi fizikalno - kemijskimi postopki, pa se lahko občasno kljub temu iz najrazličnejših vzrokov pojavijo hude reakcije. Te so večinoma blage in ne ogrožajo življenja, vendar pa prihaja tudi do resnih zapletov, ki jih je treba nemudoma zdraviti (9).

1.3.1 Oblike neželenih transfuzijskih reakcij

Reakcije po transfuziji krvi lahko razdelimo glede na to, kdaj so se pojavile (akutne in zakasnjene) in glede na njihove patofiziološke mehanizme (imunske in neimunske). Akutne reakcije se pojavijo znotraj 24 ur po začetku transfuzije, zakasnjene pa kasneje (9). Poleg tega lahko reakcije po transfuziji krvi povzročata tudi uvajanje mikroorganizmov, kar vodi v sekundarno sepsa (9).

1.3.2 Alergijske transfuzijske reakcije

V Sloveniji smo v letu 2007, zabeležili 68, leta 2010 pa 74 alergijskih reakcij in 1 anafilaktično reakcijo po prejetju transfuzije krvi (4).

1.3.3 S protitelesi IgA povezane anafilaktične/anafilaktoidne reakcije

Anafilaktične transfuzijske reakcije so akutni, potencialno življenje ogrožajoči neželeni dogodki z generaliziranimi znaki in simptomi. Običajno jih posredujejo protitelesa razreda IgE, lahko pa so tudi posledica reakcij med antigeni in drugimi vrstami protiteles, ki aktivirajo komplement in generirajo anafilatok sine (10). Občasno se lahko pri bolnikih s pomanjkanjem IgA razvije tudi resna reakcija po intramuskularnem dajanju protiteles podrazreda IgG4 (10).

1.3.4 Protitelesa proti IgA

Protitelesa anti-IgA, nastajajo najpogosteje pri tistih posameznikih, ki imajo najnižje koncentracije IgA, v manjšem obsegu pa lahko tudi pri tistih, ki imajo razmeroma nizke ali celo normalne nivoje IgA, pri čemer pa nimajo določenega podrazreda ali alotipa IgA, zato razvijejo protitelesa z omejeno specifičnostjo (11). Pri sicer zdravih posameznikih z s-IgAD, so taka protitelesa odkrili pri 36,8 % tistih, ki so imeli serumske koncentracije IgA < 5 mg/dL in pri 29 % tistih, s koncentracijami < 0,05 mg IgA /dL (11). Zanimivo je, da je imelo 60 % posameznikov s kombiniranim pomanjkanjem protiteles IgA in IgG2 prisotna protitelesa anti-IgA, prav tako pa so jih potrdili tudi pri 50 % bolnikov z s-IgAD, pri katerih se je klinična slika zapletla zaradi prisotnosti RA, 77 % tistih, s sočasno prisotnim juvenilnim RA in 100 % tistih s sočasnim SLE (11). Poleg tega so ugotovili, da je imelo 73 % bolnikov s pomankanjem IgA in ataksijo-telangiektazijo prav tako prisotna protitelesa anti-IgA (11).

1.3.5 Pogostost alergijskih transfuzijskih reakcij pri osebah s pomankanjem protiteles razreda IgA

Sandler in sodelavci so poročali, da so samo v 18,1 % od 359 testiranih serumov bolnikov z anafilaktičnimi ali anafilaktoidnimi transfuzijskimi reakcijami našli protitelesa anti-IgA (11). Grobo oceno tveganja za incidenco hudih alergijskih reakcij, povezanih s transfuzijo, so naredili v sistemu Québec Hemovigilance. V primeru transfuzije eritrocitnih pripravkov so poročali o tveganju 4,3 / 100.000 enot, v primeru transfuzij trombocitov pa 62,6 / 100.000 zlivkov trombocitov (11). V retrospektivni študiji, izvedeni na kliniki v Clevelandu, so ugotovili 10,4 hude reakcije / 100.000 transfuzij trombocitov, 3,5 / 100.000 transfuzij plazme in 1,7 / 100.000 transfuzij eritrocitnih koncentratov (11). Točnih vzrokov za večino hudih alergijskih reakcij po transfuziji pa zelo pogosto ne ugotovijo (11).

1.4 Krvni pripravki, primerni za uporabo pri pacientih s pomankanjem protiteles razreda IgA

Transfuzija krvi oz. krvnih pripravkov je upravičena in učinkovita le tedaj, ko prejemniku s tovrstnim zdravljenjem zagotovimo tisto sestavino krvi, ki jo resnično potrebuje, in to v takšni

količini ter obliki, da dosežemo kar najboljši terapevtski učinek (12). Za bolnike s pomankanjem protiteles IgA, ki imajo sočasno prisotna protitelesa proti IgA, lahko uporabljamo le tiste krvne pripravke, ki vsebujejo $> 0,5$ mg/L IgA (13). To so koncentrirani eritrociti, trombociti, sveže zamrznjena plazma in plazemski derivati (14).

1.4.1 Priporočila Sveta Evrope glede priprave krvnih komponent

V priporočilih Sveta Evrope (izdaje 7-10) glede transfuzij, namenjenih osebam s pomankanjem protiteles IgA, je zapisano, da mora biti v enoti krvnega pripravka manj kot 0,2 mg IgA (4). V zadnjem priporočilu (2013) pa je navedeno, da naj se v supernatantih krvnih pripravkov določa le koncentracija celokupnih proteinov, ki mora biti $< 0,5$ g na enoto krvnega pripravka (13).

1.5 Metode za določanje protiteles IgA

Koncentracije protiteles IgA v plazmi lahko ugotavljamo na osnovi treh različnih principov, in sicer neflometrije in turbidimetrije, hemaglutinacije ter uporabe specifičnih označenih protiteles proti IgA. (11).

1.5.1. Imunodifuzija

Če dodamo antigene in protitelesa ločeno v jamice gela, ki so si dovolj blizu, bodo ti difundirali drug proti drugem in na stiku difuzijskih front tvorili precipitacijske pasove. Te nato napravimo vidne s spiranjem gela, s čimer odstranimo topne proteine in nato z uporabo ustreznih barvil, npr. Coomasie modrega. Najbolj uporabljana tovrstna metoda, je tista, ki jo je razvil Ouchterlony in jo imenujemo dvojna difuzija v dveh dimenzijah (11).

1.5.1.1 Radialna Imunodifuzija

Ouchterlonyjevo metodo lahko uporabimo za semikvantitativno določanje antigenov. Uporabna je v klinični imunologiji, npr. za določanje imunoglobulinov, transferina, C-reaktivnega proteina in komponent komplemента (1). Na ta način lahko odkrijemo tudi bolnike z najnižjimi koncentracijami IgA, pri katerih so se morda razvila protitelesa proti IgA in potrebujejo dodatna testiranja (11).

1.5.2 Imunoelektrofereza

Imunoelektrofereza je kombinacija imunodifuzije in elektroforeze. Na predmetno stekelce nalijemo raztopljeno agarozo (1-1,5 %). Ko se strdi v gel, na sredini izdobljemo jamico, globoko približno 2 mm in vanjo odpipetiramo mešanico antigenov, npr. serumskih beljakovin. Preparat nato nastavimo v električno polje za 1-2 uri, pri čemer beljakovine

potujejo skozi gel in se ustrezno porazdelijo. Po prekinitvi električnega toka v gel, vzdolž elektroforetske poti beljakovin, izdolbemo žleb, v katerega prenesemo antiserum. Antigeni in protitelesa difundirajo drug proti drugemu in na sečišču njihovih difuzijskih poti se v primeru prepoznavne oblikujejo precipitacijski pasovi. Položaj posameznega pasu določa specifična elektroforetska mobilnost posameznega serumskega proteina (11).

1.5.3 Nefelometrija in turbidimetrija

Nefelometrija je analizna metoda, pri kateri merimo intenziteto sipane svetlobe, ki pride skozi suspenzijo. Merimo jo pod kotom $15 - 90^\circ$. Sipanje svetlobe je odvisno od velikosti imunskih kompleksov v preiskovanem vzorcu, izmerjena vrednost pa je premosorazmerna koncentraciji analita (15). Turbidimetrija pa je merjenje intenzitete prepuščene svetlobe, ki je posledica sipanja, odboja in absorpcije svetlobe, in sicer pod kotom 0° , glede na vir svetlobe. Izmerjeni signal je v tem primeru obratno sorazmeren s koncentracijo analita (15).

1.5.4 Adherenca eritrocitov

Z namenom, da bi razvili hitro in občutljivejšo presejalno tehniko za ugotavljanje pomankanja IgA, so Schulenburg in sodelavci razvili metodo z adherenco eritrocitov na trdni fazi. Ta je glede občutljivosti primerljiva z radialno imunodifuzijo, a je hitrejša in lažje dostopna kot stopenjska nefelometrija, test pa ni komercialno dosegljiv (11).

1.5.5 Aglutinacijske reakcije

Aglutinacijske reakcije izvajamo tudi za dokazovanje topnih antigenov, pri čimer uporabimo takoimenovano pasivno aglutinacijo. Aglutinacijsko metodo lahko prilagodimo za presejanje velikega števila krvodajalcev. Eritrocite oseb s krvno skupino 0 RhD preslojimo z očiščenimi protitelesi IgA, ob uporabi taninske kisline ali kromovega klorida. Ta tehnično zahteven analitski postopek čedalje pogosteje nadomeščajo visoko občutljivi encimsko imunski testi (ELISA) (11).

1.5.6 Radioimunski test (RIA)

To je ena od najbolj vsestranskih in najobčutljivejših metod za določanje količine antigenov in haptenov. Z njo lahko izmerimo izredno majhne količine analita, zato je test RIA primeren za kvantitativno določanje hormonov, serumskih proteinov, zdravil in vitaminov. Test je drag, poleg tega pa vključuje tudi uporabo radioaktivno označenega antigena, zato ga v glavnem izpodrivajo testi ELISA (11).

1.5.7 Encimsko imunski testi (ELISA)

Encimsko imunski test ali test ELISA je biokemijska metoda, ki jo uporabljamo za detekcijo protiteles ali antigenov v bioloških vzorcih. Gre za enega od najbolj občutljivejših in najspecifičnejših kvantitativnih imunskih testov. Temelji na specifičnih interakcijah med antigeni in protitelesi in obstaja v številnih različicah, ki jih lahko, glede na osnovni način izvedbe, ločimo na kompetitivne in nekompetitivne. Glede na uporabljen tehniko pa jih delimo na neposredne (ang. Direct ELISA), posredne (ang. Indirect ELISA) in sendvič teste ELISA (angl. Sandwich ELISA) (16).

1.6 Metode za določanje protiteles proti IgA

Tuda za določanje protiteles proti IgA imamo na razpolago več različnih testov.

1.6.1 Pasivna hemaglutinacija (PHA)

Prvi razviti test je temeljil na pasivni hemaglutinaciji (PHA). Še vedno je uporabi v razmeroma majhnem številu referenčnih laboratorijev, saj je občutljiv in zanesljiv, čeprav časovno potraten in tehnično zahteven (11).

1.6.2 Imunski test z mikrozrci in temelji na pretočni citometriji (MIA)

Imunski test z mikrozrci na osnovi pretočne citometrije temelji na uporabi polistirenskih delcev, preslojenih s protitelesi IgA, ki jih inkubiramo s preiskovanimi serumskimi vzorci. Po spiranju dodamo anti-humana protitelesa IgG konjugirana s FITC, ki fluorescenčno označijo tista mikrozrnca, na katere so se vezala protitelesa IgA iz vzorca. Obseg fluorescence izmerimo s pretočnim citometrom (11).

1.6.3 Imunoradiometrični test (IRMA)

Na voljo so tudi trdno-fazni imunoradiometrični testi z uporabo protiteles IgA, pripetih na mikrokristalinično celulozo. Izvajajo jih številni referenčni laboratoriji, z njim pa zanesljivo odkrijejo protitelesa, specifična za ta razred, malo manj zanesljivo pa tista z omejeno specifičnostjo. Na voljo so tudi encimski imunski testi, pri katerih testne serumske vzorce inkubiramo v vdolbinicah mikroplošč, ki so obložene z IgA. (11).

1.6.4 Encimsko-immunski test (ELISA)

Protitelesa proti IgA lahko določamo z uporabo z encimi-konjugiranih protiteles proti humanih protiteles razreda IgG, s katerimi označimo protitelesa anti-IgA ki se vežejo na IgA s katerimi so obložene vdolbinice mikrotitrskih plošč. V primerjavi s predhodno opisanimi metodami je ta enostavna, hitra in učinkovita in jo zato uporabljajo v referenčnih laboratorijih, ki

preiskujejo serumske vzorce s protitelesi anti-IgA. Testi ELISA niso tako občutljivi za odkrivanje protiteles z omejeno specifičnostjo kot test s pasivno hemaglutinacijo (PHA), najverjetneje zaradi nižjih koncentracij izotipa IgA2 v serumskih vzorcih s poliklonskimi protitelesi IgA (11).

1.7 Vrednotenje analiznih metod in rezultatov

Z izvajanjem analiznih meritev želimo pridobiti ponovljive, zanesljive in točne podatke. Zato potrebujemo validacijo uporabljenih metod, s katero dokazujemo, da te dejansko služijo svojemu namenu (20).

1.7.1 Natančnost analizne metode

Z analizo natančnostjo določene metode opredelimo sipanje rezultatov pri posameznih meritvah. Natančnost nam pove, kako velike so razlike med rezultati, ki jih dobimo s ponavljanjem meritev istega vzorca. Čim manjše so, bolj natančna je metoda. V osnovi razlikujemo med natančnostjo rezultatov znotraj analize in natančnostjo rezultatov med analizami (20).

1.7.2 Analizna točnost

Analizna točnost je merilo pravilnosti metode oziroma stopnje ujemanja izmerjenih rezultatov z dejanskimi oz. pravimi vrednostmi. Analizna točnost nam torej pove, v kolikšni meri smo se s posamezno meritvijo uspeli približati dejanski vrednosti, na ta način pa odkrivamo tudi sistemske napake pri izvajanju analizne metode (20).

1.7.3 Analizna občutljivost in analizna specifičnost

Analizna občutljivost predstavlja najmanjšo količino analita v vzorcu, ki jo lahko še natančno izmerimo (20). Opredelimo jo kot naklon umeritvene krivulje, ki ga določimo glede na odziv izmerjenih signalov na spremembe koncentracije analita (20).

Analizna specifičnost pa se nanaša na sposobnost analitske metode, da z njo vzorcu zaznamo in ovrednotimo točno določeno substanco, ne pa tudi drugih, ki so v njem prav tako prisotne (npr. nečistot, razgradni produkti, matriks) (20).

1.7.4 Diagnostična občutljivost

Diagnostična občutljivost opredeljuje zanesljivo določitev tistega deleža bolnikov s preiskovano boleznijo, pri katerih je rezultat testa pozitiven. Negativni rezultati pri tistih preiskovancih, ki so dejansko bolni pa so lahko tudi lažno negativni (20).

1.7.5 Diagnostična specifičnost

Diagnostična specifičnost opredeljuje zanesljivo določitev tistega deleža preiskovancev, ki dejansko nimajo preiskovane bolezni in pri katerih je rezultat testa negativen. Pozitivni rezultati, ki jih izmerimo v vzorcih tovrstnih preiskovancev, pa so lažno pozitivni (20).

1.7.6 Pozitivna in negativna napovedna vrednost

Napovedna vrednost testa je odvisna od njegove občutljivostjo in specifičnosti ter seveda od prevalence preiskovane bolezni v populaciji. Običajno jo izrazimo v odstotkih. V primeru zelo majhne prevalence bolezni bosta pozitivna (PNV) in negativna napovedna vrednost (NNV) presejalnega testiranja vedno zelo majhni, ne glede na specifičnost in občutljivost uporabljenega testa (20).

1.7.7 Mejna vrednost

Z izrazom pražna vrednost označujemo najnižjo koncentracijo analita, ki je še klinično pomembna. Ta vrednost predstavlja mejo med pozitivnim in negativnim rezultatom testa. Določitev pražne vrednosti pomembno vpliva na ugotavljanje razširjenosti bolezni v preučevani populaciji, posledično pa tudi na diagnostično uporabnost rezultatov (20).

2. NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je:

- izvesti interno prevalenčno študijo, s ciljem ugotoviti pogostnost pomanjkanja protiteles razreda IgA med slovenskimi krvodajalci ter vzpostaviti ustrezen nacionalni register;
- validirati komercialno dostopna testa za določanje protiteles IgA in ugotavljanje prisotnosti protiteles anti-IgA v serumskih vzorcih ter sodelovati pri validaciji metod za kvantitativno določevanje protiteles razreda IgA in anti-IgA, razvitih na ZTM;
- pripraviti osnove za rutinsko testiranje krvodajalcev na pomanjkanje protiteles IgA in prisotnost protiteles proti-IgA, ter s tem vzpostaviti pogoje za zagotavljanje optimalnih krvnih pripravkov, skladno s statusom IgA krvodajalcev in bolnikov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Vzorci

Za presejalno ugotavljanje pomankanja IgA smo naključno izbrali 5.000 krvnih vzorcev krvodajalcev. Testiranje smo izvedli na Odseku za Imunohematologijo Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM), natančneje v Centru za testiranje krvi dajalcev. Kriteriji za izbor vzorcev so bili sledeči:

- starost od 18 - 55 let;
- darovanje krvi več kot 2x;
- čas po odvzemu vzorca ≤ 7 dni.

3.1.2 Kemikalije in reagenti

- Gelske kartice DiaMed Bio-Rad za določanje pomankanja IgA (Diamed Bio-Rad, Švica)
- Reagent (mikrodelci) za določanje pomankanja IgA (Diamed Bio-Rad, Švica)
- Pozitivna kontrola za določanje pomankanja IgA (Diamed Bio-Rad, Švica)
- Negativna kontrola za določanje pomankanja IgA (Diamed Bio-Rad, Švica)
- Gelske kartice DiaMed Bio-Rad za določanje protiteles anti- IgA (Diamed Bio-Rad, Švica)
- Reagent(mikrodelci) za določanje protiteles anti-IgA (Diamed Bio-Rad, Švica)
- Pozitivna kontrola za določanje protiteles anti-IgA (Diamed Bio-Rad, Švica)
- Negativna kontrola za določanje protiteles anti-IgA (Diamed Bio-Rad, Švica)

3.1.3 Laboratorijska oprema

- Pipeta, mehanska, večstopenjska, (Diamed Bio-Rad, Švica)
- Nastavki za pipete, (Diamed Bio-Rad, Švica)
- Stresalnik (Ika, Nemčija)
- Centrifuga 5810 (Eppendorf, Nemčija)
- Robot Techno Twin Station, (Diamed Bio-Rad, Švica)
- Pipetor Tecan Genesis, (Tecan AG, Švica)
- Nastavki za pipetor Tecan Genesis, (Tecan AG, Švica)

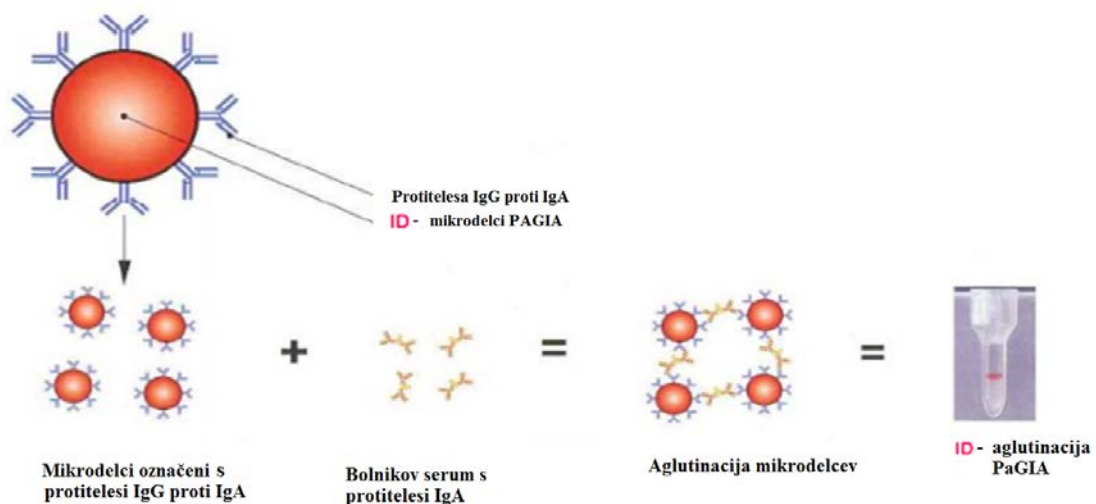
3.2 Metode

3.2.1 Testa ID PaGIA IgA Deficiency in ID PaGIA Anti-IgA Antibody

Validirali smo komercialno dostopna testa za določanje protiteles IgA in protiteles proti IgA proizvajalca BIO-RAD, ki temeljita na standardni tehniki delec-gelskega imunskega testa (PaGIA).

3.2.1.1 Princip testa ID PaGIA IgA Deficiency

Vzorec, ki je plazma ali serum, naneseemo v mikrokiveto gelske kartice proizvajalca DiaMed Bio-Rad in dodamo suspenzijo mikrodelcev, ki so polistirenska zrnca visoke gostote, obložena s kunčjimi protitelesi proti IgA. Aglutinacijo mikrodelcev v reakcijski komori gelske kartice lahko povzročijo le prisotnost človeških protiteles IgA v koncentraciji $> 0,5$ mg/L. S centrifugiranjem gelske kartice dosežemo ločbo aglutiniranih in neaglutiniranih mikrodelcev v gelskem filtracijskem matriksu vsake posamezne mikrokivete. Aglutinirani mikrodelci ostanejo ujeti v gelu ali nad njim (pozitivna reakcija), neaglutinirana zrnca pa potujejo skozi in tvorijo vidno usedlino na dnu mikrokivete (negativna reakcija). Rezultate odčitamo makroskopsko, saj so makrodelci obarvani rdeče (17).



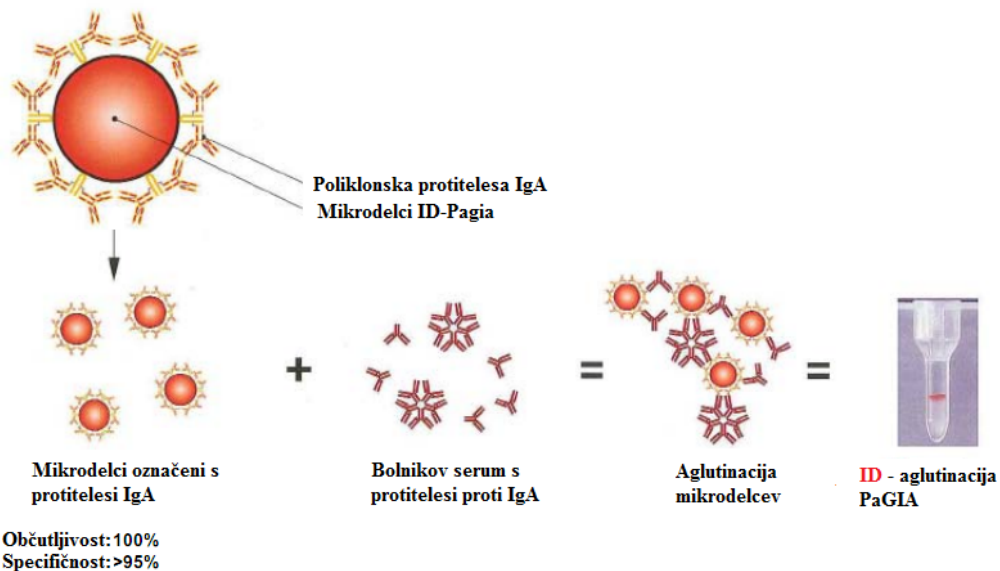
Meja detekcije 0,5 mg/dL

Normalne vrednosti pri odraslih 70-380 mg/dL

Slika 2: Princip testa ID PaGIA IgA Deficiency; prirejeno po (17).

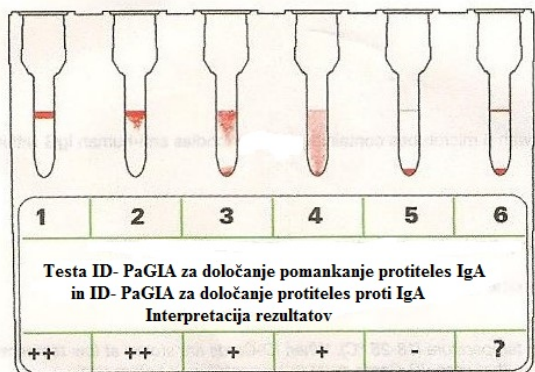
3.2.1.2 Princip testa ID PaGIA Anti-IgA Antibody

Vzorec (plazma ali serum), naneseemo v mikrokiveto gelske kartice proizvajalca DiaMed in mu dodamo suspenzijo mikrodelcev (polistirenska zrnca visoke gostote, obložena s poliklonskimi protitelesi IgA). Aglutinacijo mikrodelcev v reakcijski komori gelske kartice povzoroči prisotnost kateregakoli izotipa protiteles IgA. S centrifugiranjem gelske kartice ločimo aglutinirane od neaglutiniranih mikrodelcev v gelskem filtracijskem matriksu posamezne mikrokivete. Aglutinirani mikrodelci ostanejo ujeti v gelu ali nad njim (pozitivna reakcija), neaglutinirana zrnca pa potujejo skozi gel in tvorijo vidno usedlino na dnu mikrokivete (negativna reakcija). Rezultate odčitamo makroskopsko, saj so makrodelci obarvani rdeče (17).



Slika 3: Princip testa ID PaGIA Anti-IgA Antibody; prirejeno po (17).

3.2.1.3 Interpretacija rezultatov testov ID PaGIA IgA Deficiency in IDPaGIAAnti-IgA Antibody



Slika 4: Prikaz interpretacije rezultatov testov ID PaGIA IgA Deficiency in ID PaGIA Anti-IgA Antibody; prirejeno po (17). *Legenda:*

1 do 4: Pozitivna reakcija (+): aglutinacija v obliki rdeče črte na gelu oziroma izrazite rdeče obarvanosti porazdeljene v zgornjem delu gela ali po celotnem gelu. Pozitiven rezultat testa ID PaGIA IgA Deficiency kaže na koncentracijo IgA, ki je $> 0,5 \text{ mg/L}$ oziroma prisotnost specifičnih protiteles proti IgA v testu ID PaGIA Anti-IgA Antibody.

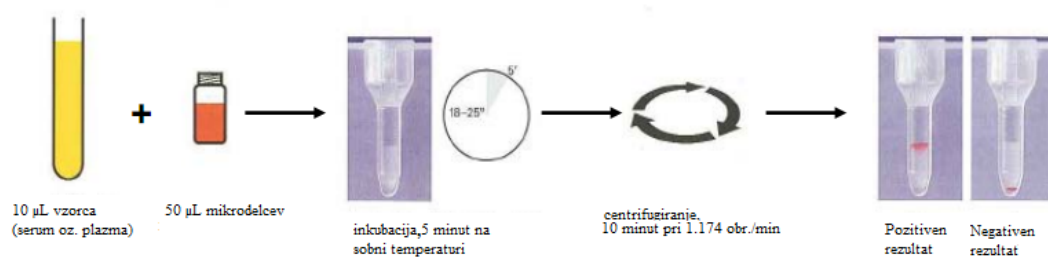
5: Negativna reakcija (-): popolna sedimentacija mikrodelcev v obliki usedline na dnu mikrokivete, brez vidne aglutinacije v gelu. Negativen rezultat testa ID PaGIA IgA Deficiency kaže na hudo pomanjkanje IgA ($\text{IgA} < 0,5 \text{ mg/L}$) oziroma na odsotnost protiteles proti IgA protiteles v primeru testa ID PaGIA Anti-IgA Antibody.

6: Dvomljiva reakcija (?): ostanki fibrina v vzorcu lahko zadržijo neaglutinirane mikrodelce, kar se kaže v obliki rdeče črte na površini gela, medtem ko so vsi ostali mikrodelci na dnu mikrokivete, brez sledi vmesne aglutinacije. Tak vzorec ponovno centrifugiramo 10 minut na 3000 obratih in test ponovimo. V kolikor so rezultati ponovno dvomljivi, je izid testa neveljaven.

3.2.1.4 Postopek izvedbe testov ID PaGIA IgA Deficiency in ID PaGIA Anti-IgA Antibody

Najprej naneseemo po 10 μL plazme ali seruma v posamezno mikrokiveto gelske kartice, nato pa dodamo še po 50 μL mikrodelcev ID PaGIA (polistirenska zrnca z veliko gostoto, obložena s kunčjimi protitelesi anti-IgA za test pomanjkankja protiteles razreda IgA oz. s poliklonskimi človeškimi IgA za ugotavljanje prisotnosti protiteles proti IgA), ki jih pred nanosom dobro premešamo s centrifugiranjem. Gelsko kartico nato inkubiramo 5 minut na sobni temperaturi in jo centrifugiramo 10 minut pri 1.174 obr./min (centrifuga DiaMed ID,

Diamed Bio-Rad) (Slika 5). Rezulate interpretiramo skladno z navodili, ki so priložena komercialnima kompletoma ID PaGIA IgA Deficiency Test in ID PaGIA Anti-IgA Antibody Test. Pred vsakim testiranjem vzorcev analiziramo tudi pozitivne in negativne kontrole IgA oziroma anti-IgA, ki so sestavni del testnih kompletov. Pozitivna kontrola za test ID PaGIA IgA Deficiency Test vsebuje koncentraciji protiteles IgA, ki je višja od mejne (0,5 mg/L), zato pride do vidne aglutinacije med rdeče obarvanimi mikrodelci, obloženimi s protitelesi anti-IgA in protitelesi IgA v kontroli. V pozitivni kontroli testa ID PaGIA Anti-IgA pa so prisotna protitelesa anti-IgA, ki povzročijo aglutinacijo mikrodelcev obloženih s protitelesi IgA. Negativna kontrola testa ID PaGIA Deficiency vsebuje protitelesa v koncentraciji, ki je nižja od 0,5 mg/L, v negativni kontroli za test ID PaGIA Anti-IgA Antibody pa ni protiteles anti-IgA.



Slika 5: Shematski prikaz postopka izvedbe testov ID PaGIA IgA Deficiency in ID PaGIA Anti-IgA Antibody; prirejeno po (17).

3.2.2 Robot Techno Twin Station

V centrifugo robota vstavimo gelske kartice, v rotor za reagente pa mikrodelce ID PaGIA, ki jih predhodno dobro premešamo s centrifugiranjem, na dno reagenčne stekleničke pa namestimo magnet, da so mikrodelci vedno dobro suspendirani. Pred vsako serijo testiranja najprej nastavimo pozitivno in negativno kontrolo. S pritiskom na tipko START v aplikaciji Techno Twin Station pričnemo postopek testiranja. Takoj za tem se pojavi okence »Samples Availability«, kjer izberemo test IgA Deficiency, kar potrdimo z »Validate« in nato z »Yes« ter še enkrat z »Validate«. Robot vzorce in testni reagent odpipetira skladno z vstavljeno metodo. Rezulate nato odčitamo v meniju »Techno Validation« in jih shranimo v podatkovno bazo robota (18).



Slika 6: Robot Techno Twin Station (Diamed Bio-Rad) (18).

3.2.3 Testi ELISA za določanje protiteles IgA in anti-IgA

Z namenom določevanja vsebnosti preostalih protiteles razreda IgA v supernatantih opranih eritrocitov so na CRIDR razvili test sendvič ELISA za določanje serumskih koncentracij protiteles razreda IgA. Uporabo testa so razširili tudi na določanje koncentracije protiteles razreda IgA na krvnih vzorcih. Zasnovali so tudi dva različna ELISA testa za ugotavljanje prisotnosti protiteles proti IgA. Test mostični ELISA omogoča določanje koncentracije protiteles proti IgA, test sendvič ELISA pa določanje razreda nastalih protiteles.

3.3 Enačbe za računanje parametrov za vrednotenje rezultatov

Rezultate smo ovrednotili tako, da smo izračunali diagnostično specifičnost, občutljivost in prevalenco. Za izračun omenjenih parametrov smo uporabili naslednje enačbe:

- V primeru, ko je negativen izid testa izražal prisotnost bolezni smo diagnostično specifičnost in občutljivost izračunali sledeče:

$$\text{Diagnostična občutljivost (\%)} = \frac{\text{Pravilno negativen izid}}{\text{Pravilno negativen izid} + \text{Lažno pozitiven izid}}$$

$$\text{Diagnostična specifičnost (\%)} = \frac{\text{Pravilno pozitiven izid}}{\text{Pravilno pozitiven izid} + \text{Lažno negativen izid}}$$

- V primeru, ko je pozitiven izid testa izražal prisotnost bolezni smo diagnostično specifičnost in občutljivost izračunali sledeče:

$$\text{Diagnostična občutljivost (\%)} = \frac{\text{Pravilno pozitiven izid}}{\text{Pravilno pozitiven izid} + \text{Lažno negativen izid}}$$

$$\text{Diagnostična specifičnost (\%)} = \frac{\text{Pravilno negativen izid}}{\text{Pravilno negativen izid} + \text{Lažno pozitiven izid}}$$

$$\text{Prevalenca (\%)} = \frac{\text{Število novih primerov z boleznijo}}{\text{Število vseh ogroženih}}$$

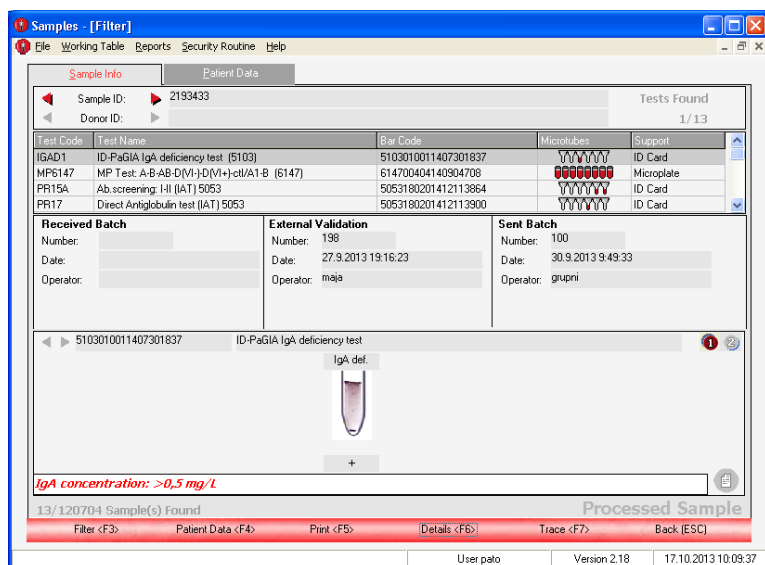
3.4 Obdelava podatkov

Podatke smo analizirali s Fisherjevim natančnim testom, saj smo pričakovali nizke frekvence zaradi majhne prevalence. Kot statistično pomembne smo upoštevali P-vrednosti dvostranskega testa, ki so bile $< 0,05$. Občutljivost, specifičnost, pozitivno napovedno vrednost (PPV), negativno napovedno vrednost (NPV) in pojavnost smo določili v okviru 95-odstotnih intervalov zaupanja. V izračune smo vključili rezultate vseh 4.624 testiranih vzorcev krvodajalcev.

4. REZULATI

4.1 Rezultati testa ID PaGIA IgA Deficiency

V prvem delu testiranja smo vzporedno primerjalno validirali test ID PaGIA IgA Deficiency in test sendvič ELISA za določanje serumskih koncentracij protiteles razreda IgA, ki so ga razvili na ZTM. Rezultate meritev na robotu Techno Twin Station (Diamed Bio-Rad) smo primerjali z izsledki testa sendvič ELISA in ugotovili, da so bili skladni pri 2.876 (99,9 %) testiranih vzorcih krvodajalcev, neskladni pa le pri 2 (2,27 %).



Slika 7: Primer prikaza rezultatov na Robotu Techno Twin Station (Diamed Bio-Rad), povzeto po (18).

V obeh primerih ugotovljenih neskladnosti med rezultati komercialno dostopnega testa, izvedenega z robotom Techno Twin Station (Diamed Bio-Rad) in testom sendvič ELISA, smo test ID PaGIA IgA Deficiency še enkrat izvedli ročno. Šlo je za vzorca z oznakama 2208919 in 2193433, ki sta glede na rezultate, dobljene na robotu Techno Twin Station, imela vrednost protiteles IgA > 0,5 mg/L (lažno pozitiven rezultat). Z ročno izvedbo komercialnega testa na gelskih karticah DiaMed smo dokazali, da je v obeh vzorcih prisotno popolno pomanjkanje protiteles razreda IgA. S tem smo potrdili rezultat testa sendvič ELISA, hkrati pa tudi pravilnost rezultatov, pridobljenih v okviru validacijskega postopka. Vzorca smo nato v dvojniku ponovno analizirali na robotu Techno Twin Station in tokrat dobili vrednosti, ki so bile < 0,5 mg/L.

V nadaljevanju presejalnega testiranja vzorcev krvodajalcev s testom ID PaGIA IgA Deficiency na robotu smo s testom sendvič ELISA primerjalno testirali le tiste, v katerih smo določili vrednosti protiteles IgA, ki so bile < 0,5 mg/L. V teh primerih so bili rezultati obeh

primerjanih testov skladni pri 2 od 4 analiziranih vzorcev (50 %). Z obema neskladnima vzorcema (2234682 in 2234684), v katerih smo z uporabo robota izmerili koncentraciji protiteles razreda IgA < 0,5 mg/L (lažno negativen rezultat), smo ponovno izvedli test ID PaGIA IgA Deficiency z ročnim nanosom in odčitavanjem gelskih kartic. Ta je, tako kot test sendvič ELISA pokazal, da v obeh omenjenih vzorcih ni bilo pomankanja protiteles razreda IgA. Oba vzorca z oznakama 2234682 in 2234684 smo nato v dvojniku ponovno testirali na robotu in tokrat potrdili rezultat ročnega testiranja.

Preglednica 2: Primerjava rezultatov, izmerjenih s komercialno dostopnim testom ID PaGIA IgA Deficiency in testom sendvič ELISA, razvitim na ZTM.

Št. vzorca	Rezultati testa ID PaGIA IgA Deficiency na robotu Techno Twin Station	Rezultat ročne izvedbe testa ID PaGIA IgA Deficiency	Rezultat testa sendvič ELISA (ZTM)
2164452	neg.	-	neg.
2195573	neg.	-	neg.
2195767	neg.	-	neg.
2195916	neg.	-	neg.
2193424	neg.	-	neg.
2208919	poz. (L.P.)	neg.	neg.
2193433	poz. (L.P.)	neg.	neg.
2234640	neg.	-	neg.
2178391	neg.	-	neg.
2234682	neg. (L.N.)	poz.	poz.
2234684	neg. (L.N.)	poz.	poz.

4.1.1 Diagnostično ovrednotenje rezultatov testa ID PaGIA IgA Deficiency

Iz dobljenih rezultatov smo izračunali: diagnostično občutljivost, diagnostično specifičnost, in prevalenco. Resnično pozitivne vrednosti koncentracij protiteles razreda IgA (>0,5 mg/L) so predstavljali tisti rezultati, ki so bili pozitivni z obema primerjanima testoma (testa ID PaGIA IgA Deficiency in sendvič ELISA), resnično negativne vrednosti koncentracij protiteles razreda IgA (< 0,5 mg/L) pa tisti, ki so bili z obema testoma negativni. Kot lažno pozitivne smo obravnavali vse rezultate, ki so bili pozitivni s testom ID PaGIA IgA Deficiency, negativni pa s testom sendvič ELISA. Lažno negativni so bili vsi rezultati, ki so bili negativni s testom ID PaGIA IgA Deficiency, pozitivni pa s testom sendvič ELISA.

V prvem delu testiranja smo med 2.878 vzorcev s testom ID PaGIA IgA Deficiency, ki smo ga izvedli na robotu Techno Twin Station (Diamed Bio-Rad) določili 5, s testom sendvič ELISA pa 7 negativnih vzorcev (Preglednica 3). Občutljivost je bila 71,4 %, specifičnost pa 99,9 %.

V drugem delu testiranja (Preglednica 4) pa smo negativne rezultate, določene s testom ID PaGIA IgA Deficiency, zaznali v 4 izmed 1.748 vzorcev krvodajalcev in le v 2 analiziranih s testom sendvič ELISA (Preglednica 5). V tem primeru je bila občutljivost 100 %, specifičnost pa 99.9 %.

Preglednica 3: Rezultati prvega dela testiranja.

Test ID PaGIA IgA Deficiency	Test sendvič ELISA		Skupaj
	Pozitiven (IgA>0,5 mg/L)	Negativen (IgA < 0,5mg/L)	
Pozitiven (IgA>0,5 mg/L)	2.871	2	2.873
Negativen (IgA < 0,5 mg/L)	0	5	5
Skupaj	2.871	7	2.878

$$\text{Občutljivost} = \frac{5}{5+2} \times 100 = 71,4\%$$

$$\text{Specifičnost} = \frac{2871}{2871+0} \times 100 = 99,9\%$$

Preglednica 4: Rezultati drugega dela testiranja

Test ID PaGIA IgA Deficiency	Test sendvič ELISA		Skupaj
	Pozitiven (IgA>0,5 mg/L)	Negativen (IgA < 0,5mg/L)	
Pozitiven (IgA>0,5 mg/L)	1.744	0	1.744
Negativen (IgA < 0,5 mg/L)	2	2	4
Skupaj	1.746	2	1.748

$$\text{Občutljivost} = \frac{2}{2+0} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Specifičnost} = \frac{1744}{1744+2} \times 100 = 99,9\%$$

Skupaj smo torej pretestirali 4.626 vzorcev krvodajalcev, od katerih je bilo 9 negativnih s testom ID PaGIA IgA Deficiency, pri čimer sta bila 2 od teh lažno negativna, 2 lažno

pozitivna (Preglednica 5). Občutljivost je bila 77,8 %, specifičnost 99,9 % in prevalenca 0,19 %.

Preglednica 5: Rezultati obeh delov testiranja skupaj

Test ID PaGIA IgA Deficiency	Test sendvič ELISA		Skupaj
	Pozitiven (IgA>0,5 mg/L)	Negativen (IgA < 0,5mg/L)	
Pozitiven (IgA>0,5 mg/L)	4.615	2	4.617
Negativen (IgA < 0,5 mg/L)	2	7	9
Skupaj	4.617	9	4.626

$$\text{Občutljivost} = \frac{7}{7+2} \times 100 = 77,8\%$$

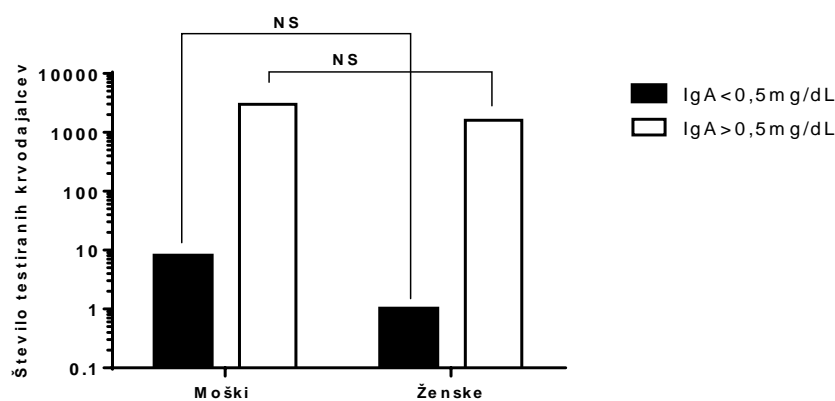
$$\text{Specifičnost} = \frac{4615}{4615+2} \times 100 = 99,9\%$$

$$\text{Prevalenca} = \frac{9}{4626} \times 100 = 0,19\%$$

Med 4.626 testiranimi krvodajalci je bilo 1.610 žensk (34,8 %) in 3.016 moških (65,2 %), pri čemer smo pomanjkanje protiteles IgA zaznali pri 8 moških in 1 ženski. Ali je ugotovljeno pomanjkanje statistično značilno povezano s spolom, smo preverili s Fisherjevim natančnim testom, in ugotovili, da razlika ni statistično značilna ($p=0.175$) (Slika 8). To pomeni, da lahko sklepamo, da je delež žensk in moških s pomanjkanjem protiteles razreda IgA v celotni populaciji zelo podoben. Struktura krvodajalcev glede na spol in pomanjkanje protiteles IgA sta predstavljena na Sliki 8.

Preglednica 6: Kontingenčna tabela za izvedbo Fisherjevega testa rezultatov določanja protiteles razreda IgA v plazemskih vzorcih 4.626 krvodajalcev.

	IgA<0,5 mg/dL	IgA> 0,5 mg/dL	Skupaj
Moški	8	3008	3016
Ženske	1	1609	1610
Skupaj	9	4617	4626



Slika 8: Porazdelitev ugotovljenih koncentracij protiteles razreda IgA glede na spol krvodajalcev (NS: $p > 0,05$).

4.2.1 Rezultati testa ID PaGIA Anti-IgA Antibody

V prvem delu presejalnega testiranja na pomanjkanje protiteles razreda IgA, smo po 2.878 pretestiranih vzorcev krvodajalcev odkrili 7, ki so imeli omenjeno pomanjkanje. Pri vseh teh smo nato izvedli še test ID PaGIA Anti-IgA Antibody z ročnim nanosom in odčitavanjem gelskih kartic ter rezultate primerjali s tistimi, ki smo jih določili s testom ELISA, razvitim na ZTM. Z obema testoma smo torej dobili skladne rezultate, kar pomeni, da smo v vseh primerih zaznali prisotnost protiteles proti IgA.

V nadaljevanju presejalnega testiranja smo med dodatnimi 1.748 pretestiranimi vzorci krvodajalcev našli še 2 s pomanjkanjem protiteles razreda IgA. Oba smo analizirali s testom ID PaGIA Anti-IgA Antibody v dvojniku in v vzorcu z oznako 2234640 ugotovili prisotnost protiteles proti IgA, v tistem z oznako 2178391, pa ne.

Preglednica 7: Primerjava rezultatov testiranja vzorcev s pomanjkanjem protiteles IgA med testoma ID-PaGIA Anti-IgA Antibody in ELISA.

Št. vzorca	ID-PaGIA Anti-IgA Antibody	testa ELISA (mostični in sendvič)
2164452	neg.	neg.
2195573	poz.	poz.
2195767	neg.	neg.
2195916	poz.	poz.
2193424	poz.	poz.
2208919	neg.	neg.
2193433	neg.	neg.
2234640	poz	-
2178391	neg.	-

4.1.1 Diagnostično ovrednotenje rezultatov testa ID PaGIA Anti-IgA Antibody

Iz dobljenih rezultatov smo izračunali: diagnostično občutljivost, diagnostično specifičnost in prevalenco. Resnično pozitivni vzorci (prisotnost specifičnih protiteles proti IgA, potrjena s testom ID PaGIA Anti-IgA Antibody) so bili tisti, ki so bili pozitivni v obeh testih (ID PaGIA Anti-IgA Antibody in ELISA), resnično negativni (odsotnost specifičnih protiteles proti IgA, potrjena s testom ID PaGIA Anti-IgA Antibody) pa tisti, ki so bili v obeh testih negativni. Za lažno pozitivne vzorce smo šteli tiste, ki so bili pozitivni v testu ID PaGIA Anti-IgA Antibody, negativni pa v testu ELISA. Lažno negativni pa so bili vzorci z negativnim izidom testa ID PaGIA Anti-IgA Antibody in s pozitivnim rezultatom testa ELISA.

Z vsemi 9 vzorci krvodajalcev, v katerih smo predhodno določili koncentracije protiteles IgA, ki so bile < 0,5 mg/L, smo izvedeli test ID PaGIA Anti-IgA Antibody z ročnim nanosom in odčitavanjem gelskih kartic. Rezultate, razen zadnjih 2, ki smo ju našli med dodatnimi 1.748 pretestiranimi vzorci, smo nato primerjali z rezultati testov ELISA za določanje prisotnosti protiteles proti IgA, razvitih na ZTM. Tako smo v 4 vzorcih odkrili prisotnost protiteles proti IgA, pri ostalih 5 pa ne. Pri izvajanju testa ID PaGIA Anti-IgA Antibody nismo dobili lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatov (Preglednica 8), kar pomeni, da sta bili v tem primeru občutljivost in specifičnost 100%.

Preglednica 8: Rezultati primerjalnega testiranja vzorcev s koncentracijo protiteles IgA < 0,5 mg/L

Test ID PaGIA Anti-IgA Antibody	Test ELISA		Skupaj
	Pozitiven	Negativen	
Pozitiven	4	0	4
Negativen	5	0	5
Skupaj	9		9

$$\text{Občutljivost} = \frac{4}{4+0} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Specifičnost} = \frac{5}{5+0} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Prevalenca} = \frac{4}{9} \times 100 = 44,4\%$$

Preglednica 9: Prikaz značilnosti vseh 9 vzorcev krvodajalcev s pomanjkanjem protiteles razreda IgA.

Št.krvod.	ID	KS	Starost	Spol	Št. odvzemov	Protitelesa anti-IgA
1259776	RS	0 RhD poz.	20	M	3	+
1051032	DW	0 RhD poz.	54	M	4	-
1147384	PM	0 RhD poz.	37	M	10	-
9501167	TD	0 RhD poz.	25	M	13	-
1263597	BS	A RhD poz.	19	M	2	-
1170084	VA	A RhD poz.	33	M	6	+
9500280	PA	AB RhD neg.	37	M	3	+
3003014	PB	AB RhD poz.	56	M	16	-
9505185	NK	AB RhD neg.	18	Ž	1	+

5 RAZPRAVA

V okviru magistrske naloge smo izvedli interno prevalenčno študijo ugotavljanja pogostnosti pomanjkanja protiteles razreda IgA med slovenskimi krvodajalci, kar je osnova za pripravo vzpostavitve registra tako prizadetih oseb. V ta namen smo validirali komercialno dostopna testa za določanje pomankanja protiteles razreda IgA in za ugotavljanje prisotnosti protiteles anti-IgA. Poleg tega smo sodelovali tudi pri validaciji testov ELISA za kvantitativno določevanje protiteles razreda IgA in protiteles anti-IgA v serumskih vzorcih, ki so jih razvili na ZTM. Med testiranjem 4.626 vzorcev krvodajlcev smo odkrili 9 takih s pomankanjem omenjenih protiteles, od teh pa so imeli 4 prisotna protitelesa proti IgA. Pogostnost pomanjkanja protiteles razreda IgA med slovenskimi krvodajalci je tako 0,19 %, kar je primerljivo z obstoječimi podatki za krvodajalce v Evropi in drugje v zahodnem svetu (7). Pogostnost prisotnosti protiteles anti-IgA med krvodajalci s pomankanjem IgA pa je bila 44,4 %.

Urgentna transfuzija krvnih komponent za posameznike s pomankanjem protiteles IgA je medicinski in logistični izziv. Če bolnike s protitelesi proti IgA ne diagnosticirajo pravilno, se lahko pri njih razvijejo hude transfuzijske reakcije in anafilaksa, seveda v primeru, da prejmejo krvne komponente, ki vsebujejo že neznatne količine omenjenih protiteles. Logistične težave so tako dvojne, in sicer zaradi tehnično zahtevnih diagnostičnih testov ter težav pri zagotavljanju ustreznih količin ustreznih krvnih komponent, v primerih nujnih transfuzij. Hitro prepoznavanje transfuzijskih reakcij, ki so povezane s protitelesi IgA, ter njihovo razlikovanje glede na druge alergijske reakcije, povezane s transfuzijo, sta ključna elementa za uspešno vodenje bolnikov. Z natančno diagnozo ne bi samo povečali varnosti bolnikov, temveč tudi upravičila uporabo redkih krvnih komponent, kot so npr. sprani koncentrirani eritrociti ali plazma krvodajalcev s pomankanjem protiteles IgA.

Trenutni diagnostični testi za ugotavljanje prisotnosti protiteles proti IgA temeljijo na zamudnih in delovno intenzivnih metodah. Hemaglutinacija in tekočinska citometrija sta sicer zanesljivi, a tehnično zahtevni in zamudni, medtem ko so imunski testi (ELISA, RIA) manj občutljivi in posledično manj zanesljivi. Novejša kvalitativna metoda, ki se uporablja za odkrivanje pomankanja protiteles razreda IgA in prisotnosti ali odsotnosti protiteles proti IgA, je test z mikrodenci v gelu (ID PaGIA). Tovrstni analitski postopek je hiter in tehnično preprost, trenutno pa so glede njihove uporabe za odkrivanje pomankanja protiteles IgA in prisotnost protiteles proti IgA na voljo še zelo omejeni podatki, zato nimamo neposredne primerjave med temi testi in drugimi že uveljavljenimi metodami (19).

Pri izvedbi testa ID PaGIA IgA Deficiency na robotu Techno Twin Station (Diamed Bio-Rad), smo pričakovali avtomatizirano izvedbo ter pravilno in natančno interpretacijo rezultatov. Ugotovili smo, da je bila diagnostična občutljivost 99,9 %, diagnostična specifičnost 77,8 %. Pred vsakim testiranjem vzorcev smo analizirali tudi pozitivne in negativne kontrole IgA, ki so sestavni del testnih kompletov. Za vse neskladne in negativne vzorce smo izvedli test ID PaGIA IgA Deficiency z ročnim nanosom in odčitavanjem gelskih kartic in rezultate primerjali z izsledki testa sendvič ELISA. Ugotovili smo, da so se rezultati obeh testov med seboj ujemali. Diagnostična občutljivost in diagnostična specifičnost sta tako bile 100 %. V literaturi smo zasledili podatke glede ročne izvedbe testa ID PaGIA IgA Deficiency in sicer: diagnostična občutljivost 91,7 % in diagnostična specifičnost 97,1 % (19). Ugotovili smo, da je test ID PaGIA IgA Deficiency ustrezen za presejalno testiranje, vendar pa ob njegovi izvedbi na robotu Techno Twin Station (Diamed Bio-Rad) le ob dodatnem skrbnem subjektivnem odčitavanju rezultatov. Prednosti tovrstnega testiranja na robotu Techno Twin Station pa so: popolnoma avtomatiziran postopek, ki je primeren za testiranje velikih serij vzorcev; hitra in enostavna izvedba; možnost prilagoditve obsega testiranja glede na potrebe; robustnost; razmeroma dolg rok uporabe reagentov in njihovo enostavno shranjevanje. Pomanjkljivosti pa so: neustrezno pakiranje, zaradi neujemanja med številom kontrolnih vzorcev in gelskih kartic glede na količino reagenta; ročni prenos kontrolnih serumov in reagentov v testne epruvete, saj sta količini vzorca in reagenta za avtomatsko pipetiranje v aparatu preveliki; tveganje za neveljavne ali lažno pozitivne rezultate zaradi morebitne prisotnosti fibrina v vzorcih, ker aparat ne interpretira mejnih vrednosti in ne opozarja na nejasnosti; visoka cena komercialno dostopnega testnega kompleta.

Test ID PaGIA Anti-IgA Antibody smo izvajali z ročnim nanosom in odčitavanjem gelskih kartic ter rezultate primerjal s tistimi, ki so jih dobili s testoma ELISA. Tega testiranja nismo izvedli z robotom Techno Twin Station (Diamed Bio-Rad), in sicer zato, ker smo imeli na razpolago majhne količine vzorcev, ki jih, tako kot reagente, za avtomatsko testiranje potrebujemo veliko. Ugotovili smo, da sta bile diagnostična občutljivost in diagnostična specifičnost 100 %. Pred vsakim testiranjem vzorcev smo najprej analizirali pozitivne in negativne kontrole protiteles anti-IgA, ki so sestavni del testnih kompletov. V literaturi smo zasledili naslednje podatke glede ročne izvedbe testa ID PaGIA Anti-IgA Antibody: diagnostična občutljivost 89,3 %, in diagnostična specifičnost 100 % (19). Zaključimo lahko, da je test ID PaGIA Anti-IgA Antibody ustrezen za presejalno testiranje.

Rezultati testiranja 4.626 vzorcev slovenskih krvodajalcev, in sicer 1.610 žensk (34,8 %) in 3.016 moških (65,2 %) na pomanjkanje protiteles razreda IgA so pokazali, da je bilo to prisotno pri 8 moških in 1 ženski. S kontingenčno analizo in Fisherjevim natančnim testom smo dokazali, da razlika glede na spol ni statistično značilna ($p = 0.175$). Preglednica 9 prikazuje lastnosti vseh 9 vzorcev krvodajalcev, v katerih smo ugotovili pomanjkanje protiteles razreda IgA. Na tej osnovi lahko pričnemo z aktivnostmi za oblikovanje in vzdrževanje registra krvodajalcev s pomanjkanjem omenjenih protiteles, kot ustreznih darovalcev krvnih komponent za bolnike z enako pomanjkljivostjo.

6 SKLEPI

- Z interno prevalenčno študijo smo ugotavljali pogostnost pomanjkanja protiteles razreda IgA med slovenskimi krvodajalci, in ugotovili, da je ta 0,19 % (9/4.4626), kar je primerljivo z objavljenimi podatki za krvodajalce v Evropi in drugje v zahodnem svetu. Pogostnost prisotnosti anti-IgA med osebami s pomanjkanjem IgA pa je 44,4 % (4/9).
- Ugotovili smo, da sta komercialno dostopna testa za določanje protiteles razreda IgA (ID PaGIA IgA Deficiency Test) in za ugotavljanje prisotnosti protiteles anti-IgA (ID PaGIA Anti-IgA Antibody Test) ustrezna za presejalno testiranje. V primeru uporabe avtomatiziranega postopka na robotu Techno Twin Station (Diamed Bio-Rad) pa je potrebno skrbno dodatno subjektivno vrednotenje rezultatov.
- Naši izsledki predstavljajo osnovo za oblikovanje in vzdrževanje registra krvodajalcev s pomanjkanjem protiteles razreda IgA.

7 LITERATURA

- [1] Vozelj M: Temelji imunologije, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 2000: 453-454.
- [2] Omersel J, Božič B: Avtoimunost - mehanizmi in pomen redoks procesov, Farmaceutski vestnik 2010; 61: 149-154.
- [3] Ihan A: Imunski odgovor v ustni votlini, MED RAZGL 1995; 34: 337-342
- [4] Gregorc T: Določanje celokupnih proteinov, IgA in protiteles IgA v opranih eritrocitnih komponentah ter krvni plazmi, Ljubljana, 2012: 1-26
- [5] Vozelj M: Temelji imunologije, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1985: 60-66.
- [6] Hevir N: Huda kombinirana imunska pomanjkljivost, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2005: 2-3.
- [7] Jörgensen H. G: Selective Immunoglobulin A deficiency in Iceland Epidemiology, Faculty of Medicine, Iceland, 2013: 25-32.
- [8] Marc D, Olson K: Hypersensitivity Reactions and Methods of Detection, NeuroScience 2009: 1-4.
- [9] <http://learn.pediatrics.ubc.ca/body-systems/hematology-oncology/blood-transfusion-reactions/> (16.04.2014).
- [10] Indian J: IgA deficiency: Implications for transfusion, Med Res. 2006; 123: 591-592.
- [11] R.R.Vassallo: IgA anaphylactic transfusion reactions, Immunohematology 2004; 20: 226-232.
- [12] Brič I, Hrašovec L. A, Lampreht N, Marić I, Železnik K: Življenje teče, Letno poročilo transfuzijske službe v Sloveniji, Ljubljana, 2011: 15-17
- [13] Keitel S: Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components Red cell components, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Francija, 2013; 17: 266-298
- [14] <http://www.transfusionmedicine.ca/articles/iga> (25.12.2012)
- [15] Hohler P, Retelj A, Kroflič A, Robič K: Teoretične osnove nefelometrije in turbidimetrije, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010: 1-3
- [16] Šmid A: Določanje antimikrobnih protiteles s pomočjo encimsko imunskega testa (ELISA), Imunologija v laboratorijski diagnostiki, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011: 1-1
- [17] Reagenčni list: BIO-RAD, ID PaGIA Deficiency Test in ID PaGIA Anti-IgA Antibody Test (B020711, B020611, 05.10)
- [18] Techno Twin Station: User Manual, DiaMed AG, 2007: V 5,3
- [19] Oltean S, Epure A, Lindsom K, Pardi C: Detection of anti-IgA antibodies using the particle gel immunoassay, Blood transfusion 2014; 12: 334-339.

- [20] Merjak M: Določanje od fosfatidilserina odvisnih protiteles proti protrombinu razreda a z encimsko imunsko metodo na trdnem nosilcu, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015:18-28.
- [21] Vižin T: Imunski testi, Farmacevtska biokemija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2013: 12.

