

ЗНАЧАЈ ОДРЕЂИВАЊА КОНЦЕНТРАЦИЈА ПОТКЛАСА ИМУНОГЛОБУЛИНА G И A – НАША ИСКУСТВА

Ивана ЈАГЛИЧИЋ, Оливера САВИЋ, Бојана РОДИЋ

Лабораторија за имунохемијска испитивања, Институт за трансфузију крви Србије, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ

Недостатак поткласа имуноглобулина G (*IgG*) и имуноглобулина A (*IgA*) може бити парцијалан и потпун, а нису ретки ни удружени недостаци две поткласе и више њих. У овом раду је анализирано 65 серума испитаника код којих су постојале клиничке индикације за квалитативно и квантитативно испитивање имуноглобулина. Потврђена је висока корелација ($r=0,93$) метода ласерске нефелометрије, којим је одређивана концентрација укупног *IgG*, и метода *RID*, којим је одређивана концентрација поткласа *IgG*. Концентрације поткласа *IgG* анализирани су ради откривања недостатака (14 испитаника) и значајно повишених концентрација (14 испитаника). Анализа пола и старости у овим групама испитаника показала је да постоји статистички значајно већа учесталост женског пола и деце у групи с повећаним концентрацијама поткласа *IgG* ($p<0,025$). У групи са сниженом концентрацијом поткласа *IgG* и нормалним укупним *IgG* више је заступљен недостатак *IgG4*, а у групи са сниженим укупним *IgG* већина је имала недостатак поткласе *IgG1*. Удружени недостатак поткласа *IgG* и *IgA* утврђен је код 43% испитаника. Одређивање концентрације поткласа *IgG* и *IgA* показује своју оправданост код сви испитаника са клиничким симптомима, без обзира на то да ли су концентрације укупног *IgG* нормалне или снижене. За адекватно тумачење резултата неопходно је било дефинисати референтне вредности за одређен узраст у нашој популацији.

Кључне речи: поткласе имуноглобулина; имунодефицијенција

УВОД

Имунодефицијенције су хетерогена група обољења чије клиничке манифестације могу бити од учесталих, односно продужених инфекција, до развоја алергијских, лимфопрлиферационих или аутоимунских поремећаја [1]. Крајњи циљ профила имуноглобулинског одговора је ефикасна елиминација патогена и у зависности је од природе и пута уношења антигена [2]. Поткласе *IgG1* и *IgG3* се производе као одговор на протеинске антигене (на пример, тетанус и *diphtheria toxoid*), а *IgG2* поткласа је значајна у одбрани од бактерија (на пример, *Pneumococcus*) које су носиоци угљенохидратних антигена [3]. Концентрације укупног *IgG* и сваке поткласе *IgG* показују типичан образац повећања у току детињства, а варирају и у зависности од расе, *Gm* алотипа и инфекције [4]. Потпуни недостатак поједине поткласе *IgG* врло се ретко открива, а настаје као последица мутације или делеције гена [5]. Лабораторијски се потврђује применом најосетљивијих метода за одређивање концентрација (*ELISA*, *RIA*). Парцијални недостатак је последица поремећаја у регулацији синтезе молекула *IgG*, може се потврдити мање осетљивим методима (*RID*, нефелометрија) и представља снижење концентрација једне поткласе или више поткласа *IgG* испод доње референтне вредности за одређену старосну групу [6]. Бројни радови потврђују удруженост недостатака неке поткласе *IgG* са појединим клиничким стањима [7], али је, према подацима Светске здравствене организације, једино јасно дефинисана повезаност изолованог недостатака *IgG2* и повећане осетљивости на инфекције инкапсулираним бактеријама [8]. Такође, могућа је и удруженост недостатака појединих поткласа *IgG*. Најчешће су удружени недостаци *IgG1* и *IgG3*, као и *IgG2* и *IgG4*, који често могу бити удружени са *IgA* недостатком [9].

Недостатак *IgA* је најучесталија дефицијенција са смањеном синтезом антитела и фреквенцијом од 1:600 [10] до 1:1.000 [7]. Овај поремећај је најчешће асимптоматски, али може бити праћен и учесталим, односно продуженим инфекцијама горњих и доњих дисајних путева, запаљењским и аутоимунским поремећајима [3, 10]. Велики број особа са недостатком *IgA* (према наводима неких аутора, и до 40%) и хипогамаглобулинемијом са разноликим почетком ствара анти-*IgA* антитела *IgG* и *IgE* класе, која приликом примене лабилних и стабилних производа од крви који садрже *IgA* могу да доведу до тешких анафилактичних реакција [11, 12]. У раду су ретроспективно анализирани резултати добијени квантитативним и квалитативним испитивањем поткласа имуноглобулина серума код болесника који су током 2003. и 2004. године први пут упућени у нашу лабораторију.

ЦИЉ РАДА

Циљ истраживања је био да код испитаника код којих постоји сумња на поремећај у синтези антитела утврдимо дистрибуцију поремећаја поткласа *IgG* у односу на пол и старост. С обзиром на честу појаву удружености недостатака поткласа *IgG* и *IgA* [9], испитана је и учесталост удруживања ова два недостатка.

МЕТОД РАДА

Испитани су серуми 65 болесника упућених из Института за здравствену заштиту мајке и детета Србије, Универзитетске деље клинике и Клиничког центра Србије у Београду. Упутне дијагнозе су биле: *Fybrosis cystica*, *Otitis media acuta*, *Bronchiectasiae*,

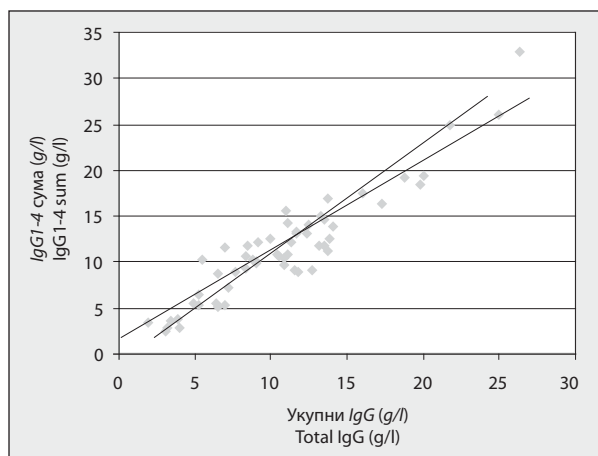
Bronchitis, Pneumonia, Asthma, Keratitis, Diarrhoea prolongata, Meningitis, Ataxia, Epilepsia. Од свих испитаника само седам болесника је упућено на квантитативно испитивање поткласа *IgG* и *IgA*, 14 на испитивање поткласа *IgA* и 44 на испитивање поткласа *IgG*. Од свих испитаника 33 је било мушког пола – 13 узроста до 15 година и 20 одраслих особа. Од 32 испитаника женског пола 19 је било дечјег узраста, а 13 одраслих особа. Коришћени су антисеруми и китови фирме *DADE Behring* и *The Binding Site*.

Концентрације *IgM*, укупног *IgG* и укупног *IgA* су одређиване имунонефелометријски [13], коришћењем *BNA* нефелометра и антисерума фирме *DADE Behring (Marburg, Germany)*. Поткласе *IgG* и *IgA* су одређиване *RID* методом по Манчинију (*Mancini*) [14] на партиген плочама фирме *The Binding Site (Birmingham, UK)*. Имуноелектрофореза је рађена по методи Шајдегера (*Scheidegger*) [15] на гелу агара. Концентрације *IgM*, укупног *IgG* и укупног *IgA* су анализирани уз помоћ табела референтних вредности за децу и одрасле особе које су дефинисане за домаћу популацију у нашој лабораторији. За анализу концентрација поткласа коришћене су табеле референтних вредности за одређени узраст препоручене од произвођача, али и табеле фирме *CLB (Amsterdam, Netherlands)* [6]. За анализу резултата коришћени су статистички методи: χ^2 -тест, χ^2 -тест за поређење пропорција из више независних узорака, проширени тест медијане и Пирсонов коефицијент линеарне корелације [16].

РЕЗУЛТАТИ

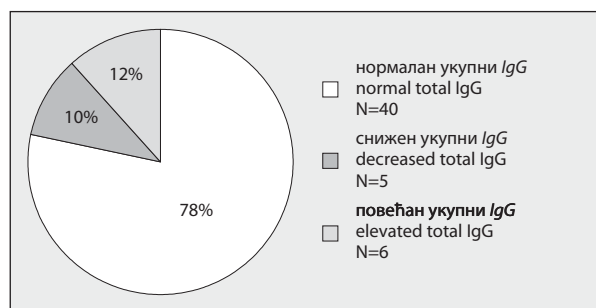
Концентрација поткласа *IgG* одређена је у 51 узорку серума. Испитивањем корелације између мерења концентрација укупног *IgG* методом нефелометрије и збира концентрација поткласа *IgG* мерених *RID* методом показана је висока корелација ова два метода ($r=0,93$) (Графикон 1).

Сви испитаници су сврстани у три основне групе: група са сниженом (пет испитаника), повишеном (шест испитаника) и нормалном концентрацијом (40



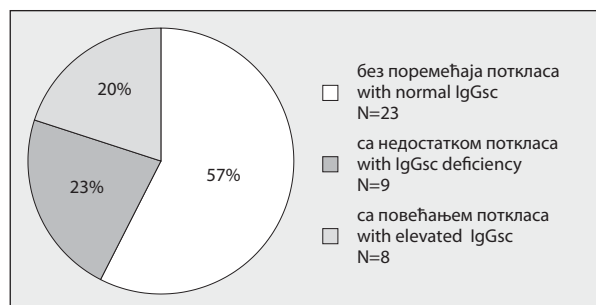
ГРАФИКОН 1. Корелација два метода мерења: нефелометрија – укупни *IgG* (x оса) и *RID* плоче – *IgG1-4* сума (y оса).

GRAPH 1. Correlation of two methods: nephelometry – total *IgG* (x-axis) and *RID* plates – *IgG1-4* sum (y-axis).



ГРАФИКОН 2. Дистрибуција концентрација укупног *IgG* у испитиваној групи (51 испитаник).

GRAPH 2. Distribution of total *IgG* concentration within examined group (51 patients).



ГРАФИКОН 3. Дистрибуција поремећаја поткласа *IgG* унутар групе са нормалним укупним *IgG* (40 испитаника).

GRAPH 3. Distribution of *IgG* subclass deficiency within group with normal total *IgG* (40 patients).

испитаника) укупног *IgG* (Графикон 2). Све три групе анализиране су у смислу откривања недостатка једне поткласе или више поткласа *IgG*. У групи са повишеном концентрацијом укупног *IgG* није утврђен ниједан недостатак поткласа. У групи са нормалном концентрацијом укупног *IgG* (Графикон 3) било је девет испитаника са недостатком поткласа *IgG* (23%). Од тог броја удружени недостатак је забележен код четири испитаника. Ни код једног испитаника није откривен недостатак све четири поткласе, а недостатак само једне поткласе утврђен је код пет испитаника. Уочено је да највећу фреквенцију има недостатак поткласе *IgG4*, који је откривен код шест испитаника (67%) (Табела 1). У групи са сниженом концентрацијом укупног *IgG* (Табела 2) код свих испитаника утврђен је комбиновани недостатак поткласа *IgG*. Недостатак све четири поткласе забележен је код три испитаника, а код по једног испитаника утврђен је недостатак три, односно две поткласе. Код ове групе испитаника, у односу на групу са нормалним укупним *IgG*, уочена је значајно ($p<0,05$) већа заступљеност недостатака *IgG1* (80% у односу на 11%).

Од 25 деце која су подвргнута испитивању код шесторо (24%) је уочен неки облик недостатка поткласа *IgG*. У групи од 26 испитаних одраслих особа код осам (31%) је забележен недостатак једне поткласе или више поткласа *IgG*. Разлика у учесталости недостатака поткласа *IgG* у односу на старост није била статистички значајна ($p>0,5$). Испитивање учесталост недостатка поткласа *IgG* у односу на пол показала је сличне резултате. Од 14 испитаника код којих је забележен недостатак поткласа *IgG* десет су били мушког пола, а од тог броја шест су биле одрасле осо-

ТАБЕЛА 1. Дистрибуција недостатка поткласа *IgG* у групи испитаника са нормалним укупним *IgG*.**TABLE 1.** Distribution of *IgG* subclass deficiency within group with normal total *IgG*.

Болесник Patient	Пол-старост Sex-Age	Недостатак / Deficiency				
		<i>IgG1</i>	<i>IgG2</i>	<i>IgG3</i>	<i>IgG4</i>	<i>IgA</i>
1.	М-Д М-С	-	-	+	-	+
2.	М-Д М-С	-	-	-	+	+
3.	Ж-Д Ф-С	-	+	-	+	+
4.	Ж-Д Ф-С	-	+	+	+	-
5.	М-О М-А	-	-	+	-	-
6.	М-О М-А	-	+	+	-	+
7.	М-О М-А	+	+	-	+	-
8.	М-О М-А	-	-	-	+	-
9.	Ж-О Ф-А	-	-	-	+	-

+ – присуство дефицита; - – одсуство дефицита; М – мушко; Ж – женско; Д – дете; О – одрасла особа
+ – presence of deficiency; - – absence of deficiency; M – male; F – female; C – child; A – adult

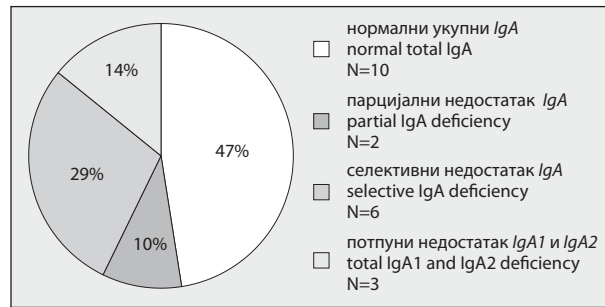
ТАБЕЛА 2. Дистрибуција недостатка поткласа *IgG* у групи испитаника са сниженим укупним *IgG*.**TABLE 2.** Distribution of *IgG* subclass deficiency within group with decreased total *IgG*.

Болесник Patient	Пол-старост Sex-Age	Недостатак / Deficiency				
		<i>IgG1</i>	<i>IgG2</i>	<i>IgG3</i>	<i>IgG4</i>	<i>IgA</i>
1.	М-Д М-С	+	-	-	+	-
2.	М-Д М-С	+	-	+	-	-
3.	М-О М-А	+	+	+	+	+
4.	М-О М-А	-	+	+	+	-
5.	Ж-О Ф-А	+	+	+	+	-

+ – присуство дефицита; - – одсуство дефицита; М – мушко; Ж – женско; Д – дете; О – одрасла особа
+ – presence of deficiency; - – absence of deficiency; M – male; F – female; C – child; A – adult

бе. Однос полова у групи одраслих испитаника био је 3:1, а у групи деце 2:1. Ова разлика није била статистички значајна ($p>0,1$).

Значајно повишене концентрације поткласа *IgG* откривене су код 14 особа, од којих је осам припадало групи испитаника са нормалним укупним *IgG* (20%), док су остали припадали групи са повишеном концентрацијом укупног *IgG*. Од укупног броја испитане деце код 12 (40%) је уочена повећана концентрација поткласа *IgG*, што чини 86% свих особа са повишеним концентрацијама поткласа. Ова заступљеност деце је била статистички значајна ($p<0,025$). Испитивања у односу на пол указују на статистички значајну заступљеност особа женског пола ($p<0,025$), којих је било десет. Највећу учесталост показало је

**ГРАФИКОН 4.** Дистрибуција концентрација *IgA* у испитиваној групи болесника.**GRAPH 4.** Distribution of *IgA* concentration within examined group.

повећање концентрације поткласе *IgG2*, која је забележена код 12 особа (86%).

Код свих испитаника код којих су одређиване концентрације поткласа *IgG* анализирана је учесталост неког облика недостатка *IgA* коришћењем резултата добијених нефелометријским одређивањем укупног *IgA* и имуноелектрофорезом. Утврђено је да код 43% испитаника постоји удружени недостатак и да је ова удруженост статистички значајна ($p<0,025$). У групи испитаника која је упућена на одређивање поткласа *IgA*, од укупно 21 испитаног серума код 11 је уочен неки облик недостатка *IgA* (52%). Код шест испитаника (29%) је уочен селективни недостатак *IgA*, али је код свих забележен недостатак поткласе *IgA1*. Парцијални недостатак *IgA* је утврђен код два испитаника. Потпуни недостатак *IgA1* и *IgA2* је забележен код три особе (14%). У испитиваној групи болесника ни су забележени случајеви са нормалним укупним *IgA*, а сниженим вредностима поткласа *IgA*. Од свих испитаника код којих је утврђен неки облик недостатка *IgA* код само три болесника (27%) се испојио и недостатак неке од поткласа *IgG*. Ова удруженост није била статистички значајна ($p>0,1$) (Графикон 4).

ДИСКУСИЈА

Будући да концентрације поткласа не подлежу нормалној Гаусовој расподели, а у недостатку референтних вредности за нашу популацију, сматрали смо да се применом табела англосаксонских аутора које за распон референтних вредности имају оне између 2,5 и 97,5 перцентила са великом вероватноћом може утврдити недостатак поткласа *IgG* код наших испитаника [6]. Смањена синтеза једне од поткласа *IgG* може изазвати компензаторно повећање синтезе осталих поткласа [1, 6], што може довести до нормалне концентрације укупног *IgG*. У нашем испитивању смо унутар групе са нормалним вредностима укупног *IgG* забележили да код 23% испитаника постоји недостатак неке од поткласа *IgG*, што указује на оправданост за одређивање концентрације поткласа *IgG* код свих болесника са клиничким симптомима.

Да би се утврдила удруженост недостатка поткласа *IgG* и *IgA*, а у немогућности да се код свих испитаника који су упућени на испитивање поткласа *IgG* одреди и концентрација поткласа *IgA*, као помоћни метод за утврђивање недостатка *IgA* коришћен је, поред нефелометријског одређивања укупног *IgA*, и ме-

тод имуноелектрофорезе. На основу добијених резултата (Табеле 1 и 2) доказано је да код 43% испитаника постоји удруженост ова два недостатка, што је у складу са подацима из литературе [1, 7-10]. С обзиром на овако велику учесталост и могуће компликације током супституционе терапије [11, 12], сматрали смо да је потребно одређивање поткласа *IgA* код свих облика недостатка *IgG*.

Висока учесталост недостатка поткласа *IgG* и *IgA* у испитиваним групама болесника може се објаснити начином формирања група, уз строго поштовање препорука о индикацијама за мерење поткласа. Неочекиван је податак да су у овој групи одрасле особе заступљеније од деце, што може указати на касасно откривање недостатка, али и да се код ове групе испитаника тек у зрелој доби испољавају клиничке манифестације недостатака. Наши резултати указују на највећу учесталост недостатака *IgG4* у домаћој популацији, што је у складу са подацима из литературе [1, 6-8]. Међутим, у тумачењу и наших и података из литературе треба имати у виду да се недетектабилни *IgG4* (мање од 0,01 g/l) често јављају код мале деце и да је у питању пролазна појава [3, 4]. Значајно већа заступљеност деце у групи са повећаном концентрацијом поткласа, као и већа учесталост повећања вредности поткласе *IgG2* може се објаснити као физиолошки одговор на природну и вештачку имунизацију [1]. С обзиром на наше (у тексту неприказане) прелиминарне резултате који указују на значајно повећање релативних концентрација поткласа *IgG*, а нарочито *IgG2*, у испитиваној групи деце у односу на податке из литературе [6], сматрамо да је за адекватно тумачење резултата неопходно дефинисати референтне вредности за одређени узраст у нашој популацији. Ово би био скуп и компликован подухват који захтева подршку званичних институција.

ЗАКЉУЧАК

Вредности концентрација укупног *IgG* које су испод доње границе референтних вредности за одређену старосну групу указују на постојање поремећаја у синтези антитела. Код ових болесника је неопходно одредити концентрације поткласа *IgG* ради потпуног дефинисања недостатка. Вредности укупног *IgG* које не одступају од референтних за одређену старо-

сну групу не значе *a priori* и одсуство недостатака у синтези антитела, те је одређивање концентрација поткласа *IgG* значајно за све болеснике код којих се јављају клинички симптоми. У нашим испитивањима потврдили смо потребу за испитивањем поткласа *IgA* код свих облика недостатка *IgG*. Налаз снижене концентрације једне поткласе или више поткласа *IgG* не представља дефинитивну дијагнозу, али свакако указује на поремећај имунског система и захтева даља испитивања.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rich RR. Clinical immunology principles and practice. London: Churchill-Livingstone; 2001.
2. Janeway ChA, Travers P, Walport M, Shlomchik. Immunobiology. London: Churchill-Livingstone; 2001. p.406-7; 448-9.
3. Lee SI, Heiner DC, Wara D. Development of serum IgG subclass levels in children. Monogr Allergy 1986; 19:108-21.
4. French M. Serum IgG subclasses in normal adults. Monogr Allergy 1986; 19:100-7.
5. Schroeder HW. Genetics of IgA deficiency and common variable immunodeficiency. Clin Rev Allergy Immunol 2000; 19:127-32.
6. Meulenbroek AJ. Human IgG subclasses: useful diagnostic markers for immunocompetence. Amsterdam: CLB; 2000. p.16-19; 24-33.
7. Bradwell AD. IgG and IgA subclasses in disease. Birmingham: The Binding Site Ltd; 1995. p.4-7; 9-12; 23-9; 128-35.
8. WHO Scientific Group. Primary immunodeficiency diseases. Clin Exp Immunol 1995; 1:99-101.
9. Oxelius VA, Carlsson AM, Hammarstrom L, Bjorkander J, Hanson LA. Linkage of IgA deficiency to Gm allotypes; the influence of Gm allotypes on IgA - IgG subclass deficiency. Clin Exp Immunol 1995; 99:211-5.
10. Edwards E, Razvi E, Cunningham-Rundles C. IgA deficiency: clinical correlates and responses to pneumococcal vaccine. Clin Immunol 2004; 111:93-7.
11. Hammarstrom L, Person MAA, Smith SIB. Anti-IgA in selective IgA deficiency. Scand J Immunol 1983; 18:509-13.
12. Burks AW, Sampson HA, Buckley RH. Anaphylactic reactions after gammaglobulin administration in patients with hypogammaglobulinemia. N Engl J Med 1986; 314:560-5.
13. Miletić VD, Miletić I. Imunoheмијске методе. Beograd: Друштво медицинских биохемичара; 1997. p.59-61; 80-1.
14. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigen by single radial immunodiffusion. Immunochemistry 1965; 2:235-9.
15. Scheidegger JJ. Une micro-methode de l'immuno-electrophorese. Int Arch Allergy 1955; 7:103-7.
16. Marinković-Erić J, Dotlić R, Janošević S, et al. Statistika za истраживаче u области медицинских наука. Beograd: Медицински факултет; 2001. p.217-42.

SIGNIFICANCE OF DETERMINING CONCENTRATIONS OF SUBCLASSES OF IgG AND IgA – OUR EXPERIENCE

Ivana JAGLIČIĆ, Olivera SAVIĆ, Bojana RODIĆ

Laboratory for Immunochemical Research, Blood Transfusion Institute of Serbia, Belgrade

ABSTRACT

Selective IgG and IgA subclass (IgG₁ and IgA₁) deficiencies may be either partial or complete, yet, combined subclass deficiencies are common. The serums of 65 patients with various clinical symptoms were investigated for quantitative and qualitative immunoglobulin levels. A high correlation ($r=0.93$) between the two methods used for measuring total IgG concentration (nephelometry) and IgG₁ concentration (RID measurement) was demonstrated. Patients were divided into groups according to IgG and IgA class and subclass concentrations. The serums of 51 patients were investigated for IgG₁ deficiencies. Three groups were set up and studied: a group with decreased IgG concentrations (5 patients), a group with elevated IgG concentrations (6 patients), and a group with normal IgG concentrations (40 patients). Within these groups, a total of 14 patients with decreased IgG₁ levels and 14 patients with elevated IgG₁ levels were discovered. Analyses of gender and age frequency within these groups showed that there were significantly ($p<0.025$) more children and females in the group with the elevated IgG₁ concentrations, IgG₂ being the most frequent. IgG₁ deficiency was found to be more frequent

in the group with decreased total IgG compared to the group with normal total IgG. We found IgG₁ deficiency to be significantly associated (43%) with IgA₁ deficiency within our population, therefore we recommend IgA₁ concentration measurement in all patients with IgG₁ deficiency. We confirmed that IgG₁ concentrations should be measured in all patients with clinical symptoms and decreased total IgG concentrations and even more so in patients with normal total IgG concentrations. So far, we have not investigated our healthy population, and have not obtained our own reference ranges of IgG₁ concentrations for children and adults. Therefore, the results we gained are yet to be explained, since, preliminary analysis shows elevated IgG₂ concentrations, and others to a lesser extent, in our population of children.

Key words: immunoglobulin subclasses; immunodeficiency

Ivana JAGLIČIĆ
Institut za transfuziju krvi Srbije
Svetog Save 39, 11000 Beograd
E-mail: nbti@eunet.yu