

İNFEKSİYON HASTALIKLARININ TANISINDA İMMÜNGLOBULİN G AVIDİTE TESTLERİ

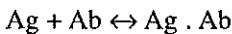
Dilek ÇOLAK

Bir mikroorganizma ile ilk karşılaşmayı takiben gelişen primer immün yanıtta, klasik olarak önce spesifik IgM, kısa bir süre sonra da spesifik IgG oluşmakta ve serumda spesifik IgM varlığının veya infeksiyonun başlangıcında ve bundan yaklaşık iki hafta sonra alınan iki farklı serum örneğinde spesifik IgG titresinde en az dört kat artışın serolojik testlerle saptanmasının akut infeksiyon lehine olduğu kabul edilmektedir. Bu yaklaşım, spesifik IgM'in spesifik IgG'den önce veya birlikte pozitifleştiği ve takip eden aylarda azalarak saptanamayacak düzeylere indiği durumlarda, yani tipik IgM yanıtı varlığında değerlidir. Bununla birlikte mikrobiyal antijenlere karşı farklı IgM yanıtı da söz konusu olabilmekte; spesifik IgM, akut infeksiyonda serumda beklenenden daha erken negatifleşebilmekte veya düşük titrelere aylar, yıllar boyunca saptanabilmektedir. Bu nedenle bir serum örneğinde spesifik IgM pozitifliği tespit edildiğinde akut infeksiyon, persisten IgM veya reaktivasyon/reinfeksiyon şeklinde sekonder infeksiyon varlığı yönünde karar verebilmek zordur. Ayrıca kan örneğinin uygun zamanda alınmaması gibi nedenler sonucunda görülen spesifik IgM negatifliği de primer infeksiyon tanısından uzaklaşmada yetersiz kalmaktadır. Gerek spesifik IgM ile ilgili yukarıda belirtilen sorunlar, gerekse hem serokonversiyonun hem de spesifik IgG titresindeki artışın takibinin belirli bir süreç gerektirmesi ve ayrıca serum örnekleri uygun zamanda alınmadığında bu yaklaşımların tanıya yardımcı olamamaları; özellikle gebelik ve immünyetmezlik gibi durumlarda primer ve sekonder infeksiyon varlığının ayırtedilmesinde erken tanıya yönelik, farklı ve güvenilir yeni test arayışlarını gündeme getirmiştir.

İmmünolojik olarak, primer infeksiyon sonrası oluşmaya başlayan spesifik IgG antikorlarının aviditelerinin, takip eden haftalar ve aylarda immün yanıtın matürasyonu ile arttığı bilinmektedir. Bir başka deyişle, primer immün yanıtın erken dönemlerinde düşük aviditeli, geç dönemlerinde ise yüksek aviditeli spesifik IgG antikorları mevcuttur. Reaktivasyon/reinfeksiyon gibi sekonder immün yanıt durumlarında da yine yüksek aviditeli antikorlar tabloya hakimdir. Bu durumda tek bir serum örneğinde spesifik IgG aviditesinin hesaplanması infeksiyon hastalıklarının tanısına yardımcı olacak bir yaklaşımdır. İşte IgG avidite testleri, bu amaca yönelik olarak geliştirilmiş ve ticari olarak da kullanıma sunulmuş testlerdir.

Antijen-antikor birleşmesi

Bir antijen (Ag) te ona karşı oluşmuş olan antikor (Ab) oldukça kompleks reaksiyonlarla, yüzeylerinde bulunan spesifik gruplar aracılığı ile birleşmekte ve bu birleşme hidrofobik etkileşim, hidrojen bağları, elektrostatik bağlar ve Van der Waals bağları gibi nonkovalen bağlarla olmaktadır. Bu birleşmede antijenik determinant (epitop/hapten) ile monomerik antikor molekülünde bulunan antijen bağlanma bölgesinin (paratop/antihapten) yapısal olarak uyuşması büyük önem taşımakta ve epitop ile paratop bölgelerinin birbirini tamamlar nitelikte olmaları gerekmektedir. Antikorla epitop arasındaki nonkovalen bağlar ayırılabilir olduğundan, antijen-antikor bağlanması geri dönüşümlü bir reaksiyondur:



Monovalan bir antijen ile monoklonal bir antikor arasındaki bağlanmanın gücü, moleküller arasındaki itici ve çekici güçlerin net toplamı olup, antikor afinitesi (intrinsek afinite) olarak bilinmektedir ve kitle hareket kanununa göre hesaplanabilmektedir. Buna göre denge halindeki bir antijen-antikor reaksiyonunda afinite (denge sabiti; K):

$$K = \text{Afinite} = \frac{[\text{Ag} \cdot \text{Ab}]}{[\text{Ag}] \times [\text{Ab}]}$$

Burada, [Ag] ve [Ab] serbest haldeki antijen ve antikor, [Ag . Ab] ise oluşan immün-kompleks konsantrasyonlarıdır. Bu tanımlamaya göre denge halindeki bir reaksiyonda, sıvı fazdaki serbest ve kompleks oluşturmuş antijen ve antikor konsantrasyonlarının ölçümü ile afinite hesaplanabilmektedir.

Mikroorganizmalar yüzeylerinde çok sayıda antijenik determinant içerdiklerinden ve antikor moleküllerinin de en az iki bağlanma bölgeleri olduğundan; pekçok antijen-antikor reaksiyonunda multivalan bağlanma söz konusudur. Bu bağlanmanın gücü de tüm itici ve çekici güçlerin toplamı olup antikor aviditesi (fonksiyonel afinite) olarak tanımlanmaktadır. Özetlemek gerekirse; monoklonal antikor ve haptenler arasında antikor afinitesi, kompleks antijenler ve poliklonal antikorlar söz konusu olduğunda ise antikor aviditesi ölçülebilmektedir.

Afinite matürasyonu

Timusa bağımlı antijenlere karşı gelişen sekonder immün yanıtta oluşan antikorların afinitesi, primer yanıtta oluşan antikorların afinitesinden daha yüksektir. IgM yanıtında afinite matürasyonu olmadığı için bu durum; antikor yapımında IgM'den IgG'ye isotip anahtar çevrimi ile beraber gelişmektedir.

Afinite matürasyonunun derecesi antijen konsantrasyonuna bağlıdır. Yüksek antijen dozları düşük antijen dozlarına göre daha zayıf afinite matürasyonuna neden olmaktadır. Düşük antijen konsantrasyonlarında sadece yüksek afiniteli antikor reseptörü taşıyan B hücreleri uyarılarak antijene bağlanmakta ve bunu takiben hücre bölünmesi ve farklılaşma başlamaktadır. Yüksek antijen konsantrasyonlarında ise, hem yüksek hem de düşük afiniteli antikor reseptörü taşıyan B hücreleri uyarılmaktadır. Bu bilgiler ışığında; antijen konsantrasyonunun fazla olduğu infeksiyonun başlangıç döneminde hem düşük, hem de yüksek afiniteli antikorlar oluşmaktadır. Belirli bir süre sonra antijen konsantrasyonu azalmakta ve kalan antijen yüksek afiniteli antikor reseptörü taşıyan B hücrelerini uyarmakta ve yüksek afiniteli antikor üreten klonlar gelişmektedir.

B hücreleri antijenlere karşı spesifitelerini genellikle değiştirememelerine rağmen; bir klon tarafından üretilen antikorların afinitesi, immünglobulinlerin değişken bölge genlerini etkileyen bir somatik hipermutasyonla değişebilir. Yeni yavru hücreler bu mutasyonları takiben yüksek afiniteli klonlar oluştururlar. Antikor oluşturan hücrelerde meydana gelen bu somatik mutasyonlar yüksek afiniteli antikor oluşumunda önemlidirler.

Avidite testlerinin infeksiyon hastalıklarının tanısında kullanımı

Antikorların aviditelerinin (fonksiyonel afinitelerinin) artması, antijen-antikor komplekslerinin ortamda bulunan protein denatüre edici (ayırıştırıcı) maddelere karşı daha stabil olmalarına neden olmaktadır ve buna bağlı olarak da bu maddelerle düşük aviditeli antikorların ortamdaki uzaklaştırılabildiği kabul edilmektedir. Bu temel bilgiden yola çıkılarak, immünolojik testlerde; üre, dietilamin, guanidin hidroklorid gibi protein denatüre edici maddelerin kullanılması ile antikorların aviditeleri hesaplanabilmektedir. Çeşitli araştırmacılar tarafından farklı yöntemler tarif edilmekle birlikte, antikor aviditesinin hesaplanmasın-

da bugün sıklıkla dilüsyon veya elüsyon yöntemleri kullanılmaktadır.

Dilüsyon yönteminde; protein denatüre edici madde serum dilüentine eklenerek düşük aviditeli antikorların solid fazdaki antijene bağlanmaları engellenmekte, yüksek aviditeli antikorlar ise bağlanabilmektedir. Elüsyon yönteminde ise; protein denatüre edici madde antijen-antikor kompleksi oluşuktan sonra ortama eklenmekte ve düşük aviditeli antikorlarla oluşmuş antijen-antikor kompleksi arasındaki bağların ayrışmasına neden olmakta, halbuki yüksek aviditeli antikorlarla meydana gelen antijen-antikor komplekslerine etki etmemektedir. Her iki yöntemde de hasta serumlarının protein denatüre edici madde içeren ve içermeyen solüsyonlarla paralel olarak çalışılması gerekmekte ve test sonucunda her bir serum örneği için elde edilen iki absorbans (optik dansite: OD) karşılaştırılarak antikor aviditesi hesaplanmaktadır. Bugün ticari olarak kullanıma sunulmuş enzim immün assay prensibi ile çalışan kitlerde elüsyon yöntemi kullanılmakta ve sonuçta Avidite İndeksi (AI) hesaplanmaktadır:

$$AI = \frac{OD \text{ (protein denatüre edici madde içeren test)}}{OD \text{ (protein denatüre edici madde içermeyen test)}} \times 100$$

Çeşitli araştırmacılar farklı hasta gruplarında *Rubella*, *Cytomegalovirus* (CMV), *Epstein-Barr virus*, *Varicella-zoster virus*, *Parvovirus* B19, kızamık virusu, ensefalit etkeni çeşitli viruslar, hepatit C virusu, *Toxoplasma gondii* gibi mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonlarda, spesifik IgG antikorlarının avidite matürasyonunu incelemişlerdir. *Rubella* ile ilgili olarak Hedman ve ark., aşılama sonrası ilk iki ayda sentezlenen antikorların düşük aviditeli olduğunu (AI < % 30), takibeden aylarda ise hızla yüksek aviditeli antikorların oluşmaya başladığını bildirmiştir. CMV infeksiyonlarında; Blackburn ve ark., AI < % 30 olduğunda düşük aviditeli antikorların yani primer infeksiyonun söz konusu olduğunu, benzer olarak Lutz ve ark. da kemik iliği ve solid organ transplantasyonu yapılan immünyetmezlikli olgularda % 35'in altındaki AI değerlerinin primer infeksiyon lehine olduğunu belirtmişler, ancak Lutz ve ark. bu grup hastalarda avidite matürasyonunun normal konaklara göre daha geç geliştiğine işaret etmiştir.

Sonuç olarak; farklı protein denatüre edici maddeler ve hesaplama tekniklerinin kullanılması nedeni ile henüz tam bir standardizasyon sağlanamamış olsa da; avidite matürasyonunun incelenmesinde ve buna bağlı olarak primer/sekonder infeksiyon ayırımında, tek bir serum örneği ile sonuç alınabileceği de gözönünde bulundurularak, IgG avidite testlerinin konvansiyonel tekniklere göre önemli avantajları olduğu görülmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Auer H, Vander-Mose A, Picher O, Walochnik J, Aspöck H: Clinical and diagnostic relevance of the toxoplasma IgG avidity test in the serological surveillance of pregnant women in Austria, *Parasitol Res* 86:965 (2000).
- 2- Blackburn NK, Besselaar TG, Schoub BD, O'Connell KF: Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity, *J Med Virol* 33:6 (1991).
- 3- Feldman M: Cell cooperation in the antibody response, "Roitt I, Brostoff J, Male D (eds): *Immunology*, 3. baskı" kitabında s.7.1, Mosby, London (1993).
- 4- Gassmann C, Bauer G: Avidity determination of IgG directed against tick-borne encephalitis virus improves detection of current infections, *J Med Virol* 51:242 (1997).

- 5- Gray JJ, Cohen BJ, Desselberger U: Detection of human parvovirus B19-specific IgM and IgG antibodies using a recombinant viral VP1 antigen expressed in insect cells and estimation of time of infection by testing for antibody avidity, *J Virol Methods* 44:11 (1993).
- 6- Hedman K, Lappalainen M, Söderlund M, Hedman L: Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases, *Rev Med Microbiol* 4:123 (1993).
- 7- Inouye S, Hasegawa A, Matsuno S, Katow S: Changes in antibody avidity after virus infections: Detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed, *J Clin Microbiol* 20:525 (1984).
- 8- Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen AG: Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity, *J Clin Microbiol* 35:1972 (1997).
- 9- Junker AK, Tilley P: Varicella-zoster virus antibody avidity and IgG subclass patterns in children with recurrent chickenpox, *J Med Virol* 43:119 (1994).
- 10- Lazzarotto T, Varani S, Guerra B, Nicolosi A, Lanari M, Landini MP: Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection, *J Pediatr* 137:90 (2000).
- 11- Lazzarotto T, Varani S, Spezzacatena P, Gabrielli L, Pradelli P, Guerra B, Landini MP: Maternal IgG avidity and IgM detected by blot as diagnostic tools to identify pregnant women at risk of transmitting cytomegalovirus, *Viral Immunol* 13:137 (2000).
- 12- Lutz E, Ward KN, Gray JJ: Maturation of antibody avidity after primary human cytomegalovirus infection is delayed in immunosuppressed solid organ transplant patients, *J Med Virol* 44:317 (1994).
- 13- Lutz E, Ward KN, Szydlo R, Goldman JM: Cytomegalovirus antibody avidity in allogeneic bone marrow recipients, *J Med Virol* 49:61(1996).
- 14- Ory F, Antonaya J, Fernandez MV, Echevarria JM: Application of low-avidity immunoglobulin G studies to diagnosis of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis, *J Clin Microbiol* 31:1669 (1993).
- 15- Owen M, Steward M: Antigen recognition, "Roitt I, Brostoff J, Male D (eds): *Immunology*, 3. bas-ki" kitabında s.6.1, Mosby, London (1993).
- 16- Ruellan-Eugene G, Barjot P, Campet M, Vabret A, Herlicoviez M, Muller G, Levy G, Guillos B, Freymuth F: Evaluation of virological procedures to detect fetal human cytomegalovirus infection, *J Med Virol* 50:9 (1996).
- 17- Souza VAUF, Pannuti CS, Sumita LM, de Andrade HF: Enzyme-linked immunosorbent assay-IgG antibody avidity test for single sample serologic evaluation of measles vaccines, *J Med Virol* 52:275 (1997).
- 18- Söderlund M, Brown CS, Cohen BJ, Hedman K: Accurate serodiagnosis of B19 parvovirus infections by measurement of IgG avidity, *J Infect Dis* 171:710 (1995).
- 19- Thomas HIJ, Morgan-Capner P: The use of antibody avidity measurements for the diagnosis of rubella, *Rev Med Virol* 1:41(1991).
- 20- Thomas HIJ, Morgan-Capner P, Roberts A, Hesketh L: Persistent rubella-specific IgM reactivity in the absence of recent primary rubella and rubella reinfection, *J Med Virol* 36:188 (1992).
- 21- Tuokko H: Detection of acute measles infections by indirect and m-capture enzyme immunoassays for immunoglobulin M antibodies and measles immunoglobulin G antibody avidity enzyme immunoassay, *J Med Virol* 45:306 (1995).
- 22- Ward KN, Dhaliwal W, Ashworth KL, Clutterbuck EJ, Teo CG: Measurement of antibody avidity for hepatitis C virus distinguishes primary antibody responses from passively acquired antibody, *J Med Virol* 43:367 (1994).