

ULOGA GENOMSKE ANALIZE U PRIMARNIM IMUNODEFICIJENCIJAMA

Darko Richter¹, Jadranka Sertić²

Primarne su imunodeficijencije (PI) skupina nasljednih poremećaja u prepoznavanju i/ili uklanjanju stranih antigena. Kliničkom slikom prevladavaju teške, kronične i neobične (oportunističke, vakcinalne) infekcije. Opisano je oko 100 različitih PI, no njih manje od 20 odgovorno je za više od 90% svih slučajeva. Identifikacija mnogih gena odgovornih za PI otvorila je nove mogućnosti razumijevanja ovih poremećaja: 1) razjašnjenje kliničkih i laboratorijskih nalaza koji su najstalnije udruženi sa određenim genom; 2) utvrđivanje raspona kliničke težine pojedinog poremećaja; 3) otkrivanje različitih mutacija koje mogu uzrokovati identične kliničke i laboratorijske promjene. Sve ovo omogućuje reevaluaciju kriterija za utvrđivanje pojedinih dijagnoza PI. Postoje 3 dijagnostičke razine za dijagnozu PI: konačna, vjerojatna i moguća. Konačnom se dijagnozom smatra ona koja je utemeljena na kriterijima za koje postoji 98% vjerojatnost da će i nakon 20 godina biti jednako valjani. Skup tih kriterija uključuje dokaz molekulske genske promjene. Vjerojatna dijagnoza temelji se na skupu kliničkih i laboratorijskih obilježja koja osiguravaju oko 85% vjerojatnosti da će i nakon 20 godina pacijent imati istu dijagnozu; nedostaje molekulske genetičke potvrda. Moguća dijagnoza temelji se na nekim, no ne svim kliničkim i laboratorijskim obilježjima određenog poremećaja. Potonje dvije kategorije dijagnoza valja u konkretnih bolesnika smatrati radnima, koje tijekom vremena treba točno izdiferencirati molekulske genskim metodama. Neobično je važno da se poduzme sve kako bi se utvrdila konačna dijagnoza jer na tome počiva razumijevanje mehanizma bolesti i mogućih pridruženih poremećaja, odgovarajuća terapija (uključujući i gensku), točno genetsko savjetovanje, prenatalnu anticipaciju i in utero intervenciju (infuzija hemopoetskih matičnih stanica). Klinički fenotip nastavlja izazivati naše predodžbe o ulozi gena u zdravlju i bolesti i ostaje ključem za utvrđivanje relevantnosti nalaza molekulske genske analize.

Deskriptori: PRIMARNE IMUNODEFICIJENCIJE, MOLEKULSKO-GENSKA DIJAGNOZA

UVOD

Primarne imunodeficijencije nasljedni su poremećaji prepoznavanja i/ili uklanjanja stranih antigena. Kliničkom slikom prevladavaju *kronične, teške i neobične* (npr. oportunističke, postvakcinalne - polio, BCG) infekcije te *nenapredovanje na težini* (često u svezi s tvrdokornim infektivnim proljevom, npr. kriptosporidijom) (1). Infekcije su vodeći simptom i antibiotska terapija ovdje je samo simptomatska mjera. Bez odgovarajućeg liječenja većina imunodeficijencija završava smrtno.

Česta je pojava autoimunih i malignih bolesti.

Radi se u pravilu o rijetkim monogenetski nasljednim bolestima. Ukupna incidencija se procjenjuje na 1:10.000 poroda. Dvije najpoznatije imunodeficijencije, Brutonova spolno vezana agamaglobulinemija (XLA, *X-linked agammaglobulinemia*) i spolno vezana teška kombinirana imunodeficijencija (XSCID, *X-linked severe combined immunodeficiency*) javljaju se frekvencijom od 1:50.000, odnosno 1:100.000 poroda. Do danas je opisano više od 100 primarnih imunodeficijencija, s time da je svega dvadesetak bolesti s te liste uzrokom preko 90% slučajeva u populaciji (2). Oko 70% oboljelih muškoga je spola zbog znatnog udjela spolno recesivnih bolesti u skupini najčešćih primarnih imunodeficijencija (3).

Metode molekulske genetike omogućile su povezivanje kliničkih i

laboratorijskih nalaza s promjenama određenog gena i razdvajanje poremećaja sa sličnim kliničko-laboratorijskim promjenama prema različitim mutacijama u istom ili u različitim genima. Time je također je otvorena mogućnost prenatalne dijagnostike za ove poremećaje.

U ovom članku biti će riječi o tome kako od kliničke slike kronične, teške i/ili neobične infekcije dospjeti do konačne dijagnoze potvrđene genomskom analizom koja se danas, uvjetno rečeno, smatra konačnom uz minimalnu mogućnost promjene u daljoj budućnosti. U tom je cilju važno razumjeti zbog čega infekcije nastaju, koje su njihove osobitosti na imunodeficientnom terenu i kako nas mogu uputiti u konačnu gensku dijagnozu. Također je važno razumjeti načela laboratorijske i genske molekulske dijagnostike koja se

¹ Referentni centar za dječju alergologiju
Specijalna bolnica

za bolesti dišnog sustava djece i mladeži

² Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku
Klinički bolnički centar Zagreb

Adresa za dopisivanje:

Prim. dr. Darko Richter

Specijalna bolnica za dišne bolesti djece i mladeži

10000, Zagreb, Srebrnjak 100

E-mail: darko.richter@zg.htnet.hr

primjenjuje kod sumnje na primarne imunodeficijencije.

PATOGENEZA I PATOANATOMIJA INFEKCIJA KOD PRIMARNIH IMUNODEFICIJENCIJA

Prve nespecifične prepreke infekciji su anatomske, mehaničke i kemijske. Kada mikroorganizam prođe te prepreke, u krvotoku ga filtrira retikuloendotelni sustav slezene. Još dublje, fagociti i limfociti i njihovi humoralni proizvodi čine mrežu specifičnog prepoznavanja i uklanjanja mikroorganizama. Slika 1. prikazuje osnovne odnose. S lijeve strane prikazane su *izvanstanične bakterije*. Fagocitiraju ih polimorfonukleari izravnom fagocitozom ili fagocitozom preko nespecifičnih opsonina (C-reaktivni protein, C3b frakcija komplementa, koji se vežu za polisaharidne dijelove bakterijske stijenke). I makrofagi fagocitiraju iste bakterije, no osim funkcije "čišćenja" oni pojedine antigene predaju specifičnim limfocitima T. Limfociti B specifični za antigene bakterije (na slici nije prikazano) počinju sintetizirati IgM, ali ujedno, slično makrofagima, predaju ih izospecifičnom pomagačkom limfocitu T (Th). Limfociti B tada dobivaju pomoć od limfocita Th i diferenciraju se u smjeru određenog imunoglobulinskog izotipa (G, A, E). Imunoglobulini su najbolji opsonini koji omogućuju učinkovitu fagocitozu, a osim toga mogu angažirati komplement klasičnim putem i posredovati uništenje mikroba. U sredini slike prikazani su *nevirusni unutarstanični mikrobi* (mikobakteriji, slamonele, listerija, kvasnice). Njih mogu učinkovito ukloniti jedino makrofagi uz pomoć pomagačkih limfocita T. Nakon fagocitoze, makrofag predaje antigene specifičnom pomagačkom limfocitu Th, koji izlučuje interferon- γ (IFN- γ) i druge citokine te izravnim dodiranjem preko membranskih molekula aktivira procese oksidativnog metabolizma u makrofagu potrebne za unutarstanično ubijanje mikroba. Prema tim mikrobima nastaju i drugi oblici imune reakcije (protutijela) ali oni nisu dostatni za njihovo učinkovito uklanjanje. Preživljavanje i razmnožavanje unutarstaničnih mikroba dovodi do stvaranja opsežnih i

proširenih granuloma koje organiziraju Th limfociti (kronična granulomatozna bolest, imunodeficijencija s mikobakterijskim bolestima). S desne strane slike vidi se da na *viruse*, čiji je ciklus obligatno unutarstanični, mogu djelovati citotoksični limfociti T tako da uništavaju vlastite stanice koje na površini ispoljavaju virusne antigene. Važnu zaštitnu ulogu protiv propagacije virusne infekcije kroz krvni optok imaju neutralizirajuća protutijela, što je osobito uočljivo u sindromima s agamaglobulinemijom u kojima mogu nastati teške infekcije virusom hepatitisa C i enterovirusima (meningoencefalitis).

Infekcijski agensi potiču sve ili većinu vidova nespecifične i specifične obrane, no obično je jedan bitan za uklanjanje infekcije. Ako taj nedostaje, ostali mogu stvarati neobičnu patoanatomsku sliku. U većini stanja imunodeficijencije patoanatomskom slikom infekta dominira duboki i diseminirani, destruktivski tip upale. Eksudativna i produktivna reakcija ograničena je ili promijenjena. U sindromima *nedostatka protutijela* patoanatomska slika purulentnih infekcija osobito je opsežna. Infekcije "golim" virusima (HCV, enterovirusi) proizvode kronične atrofične promjene (jetra, mozak). U sindromima *stanične imunodeficijencije* prevladavaju slike diseminiranih unutarstaničnih infekcija (BCG, kandida, pneumocistis) sa slabom ili nikakvom limfocitnom staničnom reakcijom (izostali ili loše oblikovani granulomi). *Nedostatak leukocitnih adhezijskih molekula* karakteriziraju teške piogene infekcije i leukocitoza, s malo ili ništa gnoja. *Kroničnu granulomatoznu bolest*, u koje je poremećeno oksidativno unutarstanično ubijanje bakterija s katalazom u fagocitima, obilježava stvaranje granuloma od limfocita i makrofaga (histiocita) oko polimorfonukleara u kojima žive bakterije. U gotovo svim slučajevima teške imunodeficijencije, a osobito staničnog tipa, nalazi se vilozna atrofija crijevne sluznice i posljedica malapsorpcija zbog kronične infekcije crijeva (salmonelom, kampilobakterom, lambljom i kriptosporidijem).

KLINIČKA SLIKA

Kliničkom slikom prevladava *spektar infekcija* koje su *teške, duboke, diseminirane, kronične ili ponavljane, a često neobične (oportunističke, vakcinalne)*. Red učestalosti infekcija pojedinih organa slijedi veličinu površine izložene mikrobima: *pluća i dišni sustav, crijeva i koža*. Tu valja pribrojiti organe koji dreniraju ulazna vrata infekcije: *limfne čvorove, jetru i slezenu* kao opći filtar krvnog optoka. Ovo su najčešća mjesta infekcije, ali može biti pogođen bilo koji organ. Skoro redovita posljedica infekcija jest *nenapredovanje na tjelesnoj težini* kao odraz iscrpljivanja organizma infektom i kao odraz malapsorpcije. Kod staničnih imunodeficijencija koje zahvaćaju limfocite T može se bolest transplantata protiv primatelja - *graft versus host disease* (GVHD). Strani limfociti mogu biti majčini limfociti stečeni peripartalno ili bilo čiji limfociti preneseni transfuzijom krvnih derivata. U sliku GVHD ulazi deskvamativna eritrodermija, hepatitis i enterokolitis s viloznom atrofijom i malnutricijom. Krvne derivate namijenjene bolesnicima s primarnom imunodeficijencijom i rizikom GVHD-a valja prethodno ozračiti s 4000-6000 rad (25 Gy).

Bez odgovarajućeg i specifičnog liječenja, infekcije u imunodeficientnih osoba infaustne su u prvih nekoliko godina. Ukorijenjene infekcije pluća pneumocistisom ili diseminirana mikobakterijska bolest smanjuju uspjeh liječenja presađivanjem koštane srži. Odatle važnost prenatalne dijagnostike i rane strategije optimalnog liječenja.

DIJAGNOSTIČKI POSTUPCI I PRISTUP BOLESNIKU SA SUMNJOM NA PRIMARNU IMUNODEFICIJENCIJU

Klinika

Najvažnije je posumnjati na imunodeficijenciju u djeteta s nenapredovanjem na težini, teškim, tvrdokornim, kroničnim ili oportunističkim infekcijama sa ili bez podatka o ranoj smrti nekog od braće, ujaka ili majčinih nećaka, ili konsangvinosti, i uputiti ga u centar koji ima kliničkog iskustva, laboratorijsku logistiku i veze sa svjetskim referentnim

centrima u dijagnostici i liječenju primarnih imunodefijencija.

Na Slici 2. prikazan je razmjerno jednostavni algoritam koji vodi do konačne dijagnoze: potvrde imunodefijencije dokazom mutacije gena, nedostatka mRNA, nedostatka ili promjene konačnog proteinskog produkta ili enzima (4).

Laboratorij

U laboratorijskoj se dijagnostici koristimo niže navedenim testovima, koji se danas mogu rutinski u većim centrima izvesti ako je to potrebno u dijagnostičkom postupku.

- Kompletna krvna slika - određivanje apsolutnog broja leukocita, broja limfocita i broja neutrofila.
- Kvantitativno određivanje imunoglobulina IgG, IgA, IgM, IgE. Određivanje supklasa IgG je moguće i u nas, ali je tumačenje vrlo rastezljivo zbog nedostatka referentnih raspona.
- Određivanje sposobnosti specifičnog humoralnog odgovora - određivanjem titra izohemaglutinina ili titra protutijela na infekcije ili cjepiva s kojima je dijete bilo inokulirano.
- Imunofenotipizacija perifernih mononuklearnih stanica - u cilju dobivanja udjela i apsolutnog broja ukupnih limfocita T (CD3), limfocita B (CD19), NK stanica (CD16,56) te podskupina limfocita T: pomagačkih (CD4) i citotoksičnih (CD8); ciljano se može izvesti imunofenotipizacija perifernih mononukleara na integrinske molekule CD11/CD18 kod sumnje na LAD (*leukocyte adhesion deficiency*).
- Testovi blastične transformacije poliklonalnim aktivatorima (fitohemaglutininom - PHA, konkavanalinom A - Con A i pokweed mitogenom - PWM) i analognim stimulacijskim testovima specifičnim antigenima (npr. PPD).
- Ukupna hemolitička aktivnost komplementa - u cilju skrininga na krajnje rijetke imunodefijencije pojedinih komponenti komplementa.

- NBT test (nitro blue tetrazolium) test koristi se u određivanju sposobnosti unutarstaničnog oksidativnog ubijanja fagocitiranih mikroba.
- Određivanje antineutrofilnih protutijela i biopsija koštane srži kod neutropeničnih stanja.
- Najvažnije pretrage diferencijalno dijagnostičkih alternativa kod tvrdokornih bakterijskih infekcija pluća i dišnog sustava (CI u znoju, izgled treptaljka dišnog epitela).

Molekulsko-genska analitika

Konačni dijagnostički korak jest potvrda primarne imunodefijencije dokazom mutacije gena, nedostatka mRNA, promjene ili nedostatka konačnog strukturnog proteinskog proizvoda ili enzima. Uz manje izuzetke, najčešće se izvodi analiza genomske nuklearne DNA u potrazi za promjenama gena u podlozi primarnih imunodefijencija.

DNA je analit u molekularnoj genetici, a izdvaja se iz različitih bioloških materijala kao što je periferna krv kojoj se dodaje antikoagulant EDTA (100 µl), amnijska tekućina (1-2 ml) ili korionske resice (10 mg).

Southernova metoda otiska (Southern blot). Prva je primijenjena metoda za neposredno utvrđivanje mutacija putem polimorfnih restrikcijskih fragmenata (*RFLP, restriction fragment length polymorphism, engl.*), pri čemu mutacija stvori restrikcijsko mjesto koje prepoznaje određena endonukleaza. Kod ove metodologije genomska DNA dobivena iz leukocita pocijepa se pomoću restrikcijske endonukleaze u manje fragmente, razdvoji elektroforezom na gelu agaroze i DNA fragmenti prenesu na čvrsti nosač. Slijedi hibridizacija s DNA sandom (probe, engl.) i autoradiografija, pri čemu se otkrivaju hibridi nastali između restrikcijskih DNA fragmenata i DNA sonde komplementarne određenom dijelu gena. Iz tako dobivene sheme polimorfnih restrikcijskih fragmenata iščitava se delecija u genu (5).

Lančana reakcija polimerazom (PCR, polymerase chain reaction).

Lančana reakcija polimerazom, (PCR, *polymerase chain reaction, engl.*) brza je enzimska tehnika kojom se male količine DNA *in vitro* selektivno uvišestruče na količinu potrebnu za analizu konformacija jednolančane DNA (*SSCP, single-strand conformation polymorphism, engl.*), kloniranje i sekvencioniranje. PCR se temelji na ponavljajućim ciklusima tri reakcije uključujući denaturaciju dvolančane DNA, vezanje početnica (*primers, engl.*) na određenu regiju gena i sintezu nove dvolančane DNA. Pomoću metode PCR moguće je brzo otkriti mutacije.

SSCP (single strand conformation polymorphism) je metoda koja omogućuje otkrivanje manjih mutacija gena, pri čemu jednolančani fragmenti DNA koji se razlikuju samo u jednoj bazi imaju različitu elektroforetsku pokretljivost u gelu poliakrāmida. Razlika je uzrokovana konformacijskim promjenama *zdrave* i mutirane DNA (6). To je najčešće korištena metoda za pronalaženje mutacija pojedinih eksona koje se potvrđuju sekvencioniranjem.

Sekvencioniranje molekule DNA omogućuje utvrđivanje redoslijeda nukleotida (*A-adenin, T-timin, G-gvanin i C-citozin*) u genu i otkrivanje točne mutacije (7). Iako je danas moguće automatizirano sekvencioniranje s višebojnom fluorescentnom emisijom pri čemu se sekvence prezentiraju u formatu obojenih kodiranih elferograma, u mnogim laboratorijima još se sekvencionira ručno primjenjujući *Sangerovu tzv. dideoksi* tehniku koja se često kombinira s kloniranjem jednostruke DNA u vektor. Slijedi kontrolirana enzimatska sinteza komplementarnog lanca i formiranje fragmenata različite veličine koji se razdvajaju elektroforezom i učine vidljivim autoradiografijom. Slijed promijenjeni sekvenci troslovnih zapisa (*G → T, C → T*) iščitava se iz autoradiograma.

KRITERIJI DIJAGNOZE NAJČEŠĆIH PRIMARNIH IMUNODEFIJENCIJA

Suvremeni dijagnostički kriteriji za primarne imunodefijencije razvrstavaju se u tri kategorije koje stupnjevitom određenošću ukazuju na dijagnozu primarne imunodefijencije:

moćna, vjerojatna i konačna (definitivna) dijagnoza (8, 9). *Konačnom* se dijagnozom smatra ona koja je utemeljena na kriterijima za koje postoji 98% vjerojatnost da će i nakon 20 godina biti jednako valjani. Skup tih kriterija uključuje dokaz genske promjene, dokaz odsutnosti mRNA ili proteinskog proizvoda. *Vjerojatna* dijagnoza temelji se na skupu kliničkih i laboratorijskih obilježja koja osiguravaju oko 85% vjerojatnosti da će nakon 20 godina pacijent imati istu dijagnozu; nedostaje molekulsko-genetička potvrda. *Moguća* dijagnoza temelji se na nekim, no ne svim kliničkim i laboratorijskim obilježjima određenog poremećaja. S obzirom na polimorfizme genskih varijanti, svaki bolesnik koji ulazi u postupak evaluacije s obzirom na spomenute skupove dijagnostičkih kriterija, mora ispunjavati ključni kriterij znakovit za dotični poremećaj.

S obzirom na veliku raznovrsnost pretežito razmjerno rijetkih primarnih imunodeficijencija, molekulsko-genske pretrage izvode se u ograničenom broju centara u svijetu s interesom i iskustvom molekulsko-biološkim metodama karakteriziranja primarnih imunodeficijencija (popis svih laboratorija na Web adresi: www.genetests.org). Lokalni molekulsko-genski laboratoriji imaju zadatak suradnje s referentnim svjetskim centrima radi izolacije kvalitetne DNA ili drugog materijala na kojemu se vrše analize, a prema potrebi, interesu i mogućnostima mogu i sami izvoditi određene pretrage.

U Tablici 1. prikazane su odabrane primarne imunodeficijencije za koje su razrađeni kriteriji po stupnjevima dijagnostičke pouzdanosti. Masno su istaknute molekulsko-genske pretrage. Neke uvriježene pretrage, kao npr. razina imunoglobulina, kožni testovi ili serološke reakcije na mrtva cjepiva, nisu više među kriterijima za konačnu dijagnozu specifične imunodeficijencije, iako imaju vrijednost u postavljanju moguće ili vjerojatne dijagnoze na putu prema utvrđivanju konačne molekulsko-genske promjene.

Na Slici 3. do Slike 9. prikazan je niz odabranih kliničkih promjena koji se mogu zapaziti kod primarnih imunodeficijencija i koji moraju

potaknuti primjenu algoritma za dijagnostičko razrješavanje takvih i sličnih vodećih kliničkih znakova u smjeru dokaza primarne imunodeficijencije.

NAČELA LIJEČENJA

Infekcije u imunodeficientnih osoba treba energično liječiti u što ranijoj fazi, ili spriječiti, jer praktički nije moguće eradicirati infekciju koja se na imunodeficientnom terenu iole razmahala. Stoga treba uvijek, na najmanju sumnju na infekciju, reagirati *energičnom antibiotskom terapijom* (bolje "overtreatment" nego "undertreatment") koja se modificira prema naknadnim rezultatima mikrobioloških pretraga i *ex iuvantibus*. Ako infekcija ne reagira na antibiotike, treba uzeti u obzir gljivične, uključujući i *Pneumocystis carinii*, mikobakterijske i virusne infekcije. Katkada su potrebni invazivni zahvati za dobivanje odgovarajućeg dijagnostičkog uzorka (biopsija, bronhoalveolarni ispirak). Uklanjanje limfnog tkiva u načelu je kontraindicirano (splenektomija, tonziloadenotomija) jer predisponira još težim infekcijama. Svi krvni derivati koji mogu sadržavati žive davateljeve limfocite moraju biti negativni na CMV i ozračeni prije transfundiranja dozom od 4000-6000 rad (25 Gy) radi sprečavanja GVHD.

Specifično liječenje uključuje djelomičnu ili potpuna restauraciju imune funkcije gdje god je to moguće. Ove specifične mjere uključuju (10):

- nadomjesnu terapiju polivalentnim humanim intravenskim imunoglobulinom (IVIG),
- nadomjesnu terapiju nedostatnim enzimom (adenozin-deaminaza - ADA),
- citokine (IL-2, G-CSF, GM-CSF i rIFN γ),
- presađivanje koštane srži,
- gensku terapiju.

Na ovome mjestu nije moguće ulaziti u tančine svih ovih terapijskih zahvata, pa će biti spomenute samo neke najbitnije činjenice.

Presađivanje hematopoetskih matičnih stanica za sada je definitivni oblik liječenja za većinu staničnih i kombiniranih imunodeficijencija. Od 1968. do 1998. u svijetu je učinjeno više od 1000 transplantacija, od kojih je najviše s dijagnozom teške kombinirane imunodeficijencije, Wiskott-Aldricheva sindroma, Omenovog sindroma, nedostatka leukocitnih adhezijskih molekula I, nedostatka MHC molekula klase II, kronične granulomatozne bolesti, spolno vezanog hiper-IgM sindroma i spolno vezanog limfoproliferativnog sindroma (11). Živih je 62%. Najbolji su rezultati s HLA-genoidentičnom srži od brata ili sestre, zatim s nesrodnom HLA-identičnom srži (od nesrodnog davatelja iz banke ili registra davatelja koštane srži) te najlošiji s haploidentičnom srži (od roditelja). Učinjeno je i petnaestak transplantacija HLA-genoidentičnih, nesrodnih HLA-identičnih matičnih stanica iz pupkovine, te *in utero* transplantacije roditeljskih HLA-haploidentičnih CD34 hematopoetskih matičnih stanica s vrlo dobrim ishodima (12).

Genska terapija sastoji se u prijenosu egzogenih gena u somatsku stanicu bolesnika s namjerom da se ispravi genski nedostatak ili da se uvede nova funkcija ili svojstvo. Prva uspješna liječenja primijenjena su u dječaka oboljelih od spolno vezane teške kombinirane imunodeficijencije i to su za sada jedini klinički provedeni postupci genske terapije uopće (13). U kliničkoj se fazi ispitivanja nalazi genska terapija adenozin-deaminazom (ADA).

ZAKLJUČAK

Genomska ili molekulsko-genska analiza konačna je potvrda primarne imunodeficijencije. Ona omogućuje razumijevanje mehanizma bolesti, povezivanje genotipa i fenotipa, uočavanje pridruženih genskih poremećaja, točni genetski savjet i konačno radikalnu - gensku terapiju. Otvara mogućnost prenatalne dijagnoze, prenatalnog *in utero* liječenja te anticipiranja postnatalne strategije liječenja. Također, iz uzoraka živih potomaka i srodnika, omogućuje eruiranje točne dijagnoze u preminulih

članova obitelji davno prije sadašnje molekulsko-genske ere.

Tablica 1.

Dijagnostički kriteriji najvažnijih imunodeficijencija (5,6). Vidjeti na Internet adresi: <http://esid.org>

Table 1.

Diagnostic criteria for some of the more important immunodeficiencies (5, 6). See at: <http://esid.org>

Bolest	Klinički spektar	Moguća dijagnoza	Vjerojatna dijagnoza	Konačna dijagnoza	Napomene
Teška kombinirana imunodeficijencija T-, B- (SCID)	Nenapredovanje na težini, tvrdokorni proljev, dišne infekcije i soor u prvih 2-7 mjeseci. <i>Pneumocystis carinii</i> pneumonija i BCG diseminacija.		Muško ili žensko dijete <2 godine s manje od 20% CD3+ T stanica, apsolutnim brojem limfocita <3000/mm ³ , proliferativnim odgovorom na mitogenike <10% kontrole; ili, prisutnost majčinih limfocita u optoku.	Muško ili žensko dijete <2 godine sa: ili, a) prisutnim majčinih T stanicama, ili, b) <20% CD3+ T stanica, apsolutnim brojem limfocita <3000/mm ³ , i, dokazom mutacije jednog od slijedećih gena: <i>GC</i> , <i>JAK3</i> , <i>RAG1</i> ili <i>RAG2</i> , <i>IL-7RA</i> , aktivnost ADA <2% kontrole ili mutacija u oba alela <i>ADA</i>	Diferencijalna dijagnoza: HIV konatalna rubella DiGeorge Zap70 CD3 Cartilage hair MHC II PNP
Spolno vezana teška kombinirana imunodeficijencija T-, B+ (XSCID)	Najkasnije do 4. mj. života nenapredovanje na težini, stalne dišne infekcije i proljev; kandidoza; GVHD u nekim slučajevima transplacentno primljenih majčinih limfocita T	Muški bolesnik s >40% CD19+ B stanica u perifernoj krvi i jedno od: majčini limfociti T u perifernoj krvi majčini bratići, ujac i nećaci s anamnezom teške kombinirane imunodeficijencije	Muški bolesnik s manje od 10% CD3+ T stanica, manje od 2% CD16/56 NK stanica i više od 75% CD19+ B stanica i sve niže navedeno: nenapredovanje već prije navršenih 12 mj. IgG i IgA za >2SD ispod prosjeka za dob tvrdokorni ili ponavljani proljev, gronja dišna infekcija ili soor	Muški bolesnik sa: ili, a) nacijspljenim majčinih T stanicama; ili, b) manje od 10% CD3+ T stanica, manje od 2% CD16/56 NK stanica i >75% CD19+ B stanica, te barem jednim od: mutacija gena <i>GC</i> za γc citokinskih receptora nedostatak mRNA za γc u northern blotu nedostatak γc proteina na površini limfocita ili stanica limfocitnog reda majčini bratići, ujac ili nećaci s dokazanom teškom kombiniranom imunodeficijencijom	Diferencijalna dijagnoza: Jak3 IL-7Rα HIV
Nedostatak MHC molekula klase II	U prvih 6 mj. teške infekcije i proljev (<i>Pseudomonas</i> , CMV, <i>Cryptosporidium</i>); mediteransko stanovništvo; ekspresija MHC II molekula od 0-5%; blaži oblici omogućuju preživljenje ranog djetinjstva; čest sklerozantni kolangitis	Muški ili ženski bolesnik, s urednim brojem T ili B stanica i smanjenom (<5%) ekspresijom HLA-DR ili -DP molekula na B stanicama ili monocitima i jedno od: hipogamaglobuliemija uredna proliferacija na mitogenike, odsutna na antigene CD4+ stanice↓ nereaktivnost miješane kulture limfocita	Muški ili ženski bolesnik sa smanjenim intenzitetom ekspresije (<5% kontrole) HLA-DR ili -DP molekula na B stanicama i monocitima i <u>sve</u> niže navedeno: nenapredovanje na težini, oportunističke infekcije ili tvrdokorne virusne infekcije uredni broj T i B limfocita uredan proliferativni odgovor na mitogenike	Muški ili ženski bolesnik sa smanjenom ekspresijom (<5% normale) HLA-DR ili -DP molekula na B stanicama ili monocitima i mutacija jednog od slijedećih gena: <i>CIITA</i> <i>RFX-B</i> <i>RFX-5</i> <i>RFX-AP</i>	

Tablica 1.

Dijagnostički kriteriji najvažnijih imunodeficijencija (5,6). Vidjeti na Internet adresi: <http://esid.org>

Table 1.

Diagnostic criteria for some of the more important immunodeficiencies (5, 6). See at: <http://esid.org>

Bolest	Klinički spektar	Moguća dijagnoza	Vjerojatna dijagnoza	Konačna dijagnoza	Napomene
Nedostatak leukocitnih adhezijskih molekula (LAD)	Leukocitoza i ponavljane bakterijske infekcije (stafilokok, Gram (-) enterobakterije, gljivične infekcije. Periodontitis. Teški oblik bez CD18 ekspresije - smrt bez TKS. Umjereni oblik - preživljenje do odrasle dobi.	Dojenče s leukocitozom $>25000/\text{mm}^3$, i barem jedno od: ponavljane bakterijske infekcije teške duboke infekcije odsutnost gnoja na mjestu infekcije	Muški ili ženski pacijent s $<5\%$ normalne ekspresije CD18 na leukocitima i svim niže navedenim: ponavljane ili perzistentne bakterijske ili gljivične infekcije leukocitoza $>25000/\text{mm}^3$ odgođeno odbacivanje pupčanog bataljka i/ili neodstatno cijeljenje rana.	Muški ili ženski bolesnik sa $<5\%$ CD18 ekspresije na neutrofilima + mutacija gena <i>ITGB</i> ili odsutnost mRNA za β_2 integrin u leukocitima	
DiGeorgeov sindrom	Prvih nekoliko mjeseci: srčana greška, delecija 22q11.2, soor ili hipokalcemička tetanija; deficijencija limfocita T varira; u mnogih bolesnika spontana rezolucija tijekom prvih nekoliko godina	Muško ili žensko dijete, CD3+ stanice $<1500/\text{mm}^3$, jedno od: srčana greška hipokalcemija duža od 3 tj. koja treba liječenje dismorfija lica i anomalije nepca	Muško ili žensko dijete, CD3+ T stanice $<1500/\text{mm}^3$, delecija 22q11.2	Muško ili žensko dijete sa smanjenim brojem CD3+ T stanica ($<500/\text{mm}^3$) i barem dvoje od slijedećega: konotrunkalna srčana greška hipokalcemija >3 tj. koja treba liječenje delecija 22q11.2	
Kronična granulomatozna bolest (CGD)	Spolno vezani oblici (60-70%) teži od autosomno recesivnih; nenapredovanje na težini, teški apscesi, limfadenitisi, pneumonije i osteomijelitisi u prvoj godini; stafilokok i gljivice. Rijetki blagi oblici s prezentacijom u odrasloj dobi.		Muški ili ženski bolesnik s abnormalnim NBT ili respiracijskim lancem u aktiviranim neutrofilima ($<5\%$ od kontrole) + duboke infekcije (<i>Staphylococcus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i>), diseminirani granulomi u dišnom, probavnom i urogenitalnom traktu, nenapredovanje, hepatosplenomegalija ili limfadenopatija	Muški ili ženski bolesnik s abnormalnim NBT ili respiratornim lancem u kativiranim neutrofilima (manje od 5% kontrole) + jedno od: mutacija u <i>gp91</i> , <i>p22</i> , <i>p47</i> ili <i>p67 phox</i> ; odsutna mRNA za jedan od gornjih gena u northern blot analizi; majčini bratići, ujac ili nećaci s abnormalnim NBT ili respiratornim lancem	Diferencijalna dijagnoza: LAD sarkoidoza hiper-IgE sindrom
Spolno vezana agamaglobulinemija (XLA)	Ponavljane bine infekcije u prve 2 godine; penumokok, hemofilus. IgG obično $<2,0$ g/L, IgM i IgA $<0,2$ g/L; 20% bolesnika prikažu se s dramatičnim septičkim stanjima i često neutropenijom. Oko 10-15% ima više razine imunoglobulina i prepoznaju se iza 5 godina života	Muški bolesnik s $<2\%$ CD19+ B stanica u kojih su isključeni drugi uzroci hipogamaglobuline-mije (Tablica 2.) i barem jedno od: početak ponavljanih bakterijskih infekcija u prvih 5 godina života; IgG, IgM, IgA niži od prosjeka za dob za >2 SD; odsutni hemaglutinini	Muški bolesnik s $<2\%$ CD19+ B stanica i sve niže navedeno: početak ponavljanih bakterijskih infekcija u prvih 5 godina; IgG, IgM i IgA za >2 SD ispod prosjeka za dob; odsutni izohemaglutinini i/ili slab odgovor na cjepiva; isključeni ostali uzroci hipogamaglobuline-mije	Muški bolesnika s $<2\%$ CD19+ B stanica i barem jedno od navedenoga: mutacija <i>Btk</i> ; odsutna mRNA za <i>Btk</i> u northern blot-u na neutrofilima ili monocitima; odsutan <i>Btk</i> protein u monocitima ili trombocitima; majčini bratići, ujac ili nećaci s manje od 2% CD19+ B stanica	Diferencijalna dijagnoza: nedostatak teškog μ -lanca nedostatak λ_5 nedostatak $\text{Ig}\alpha$

Tablica 1.

Dijagnostički kriteriji najvažnijih imunodeficijencija (5,6). Vidjeti na Internet adresi: <http://esid.org>

Table 1.

Diagnostic criteria for some of the more important immunodeficiencies (5, 6). See at: <http://esid.org>

Bolest	Klinički spektar	Moguća dijagnoza	Vjerojatna dijagnoza	Konačna dijagnoza	Napomene
Spolno vezani hiper-gM sindrom (XHIM)	Ponavljane bakterijske i oportunističke infekcije u prvoj godini života, tvrdokorni proljev (<i>Pneumocystis carinii</i> , <i>Cryptosporidium</i>); neutropenija (50%), oralni ulkusi, kolangitis i Ca jetre; IgG <0,2 g/L; IgM snižen, normalan ili povišen. Atipični slučajevi: ponavljane infekcije, anemija, hepatitis u 2.-3. desetljeću života	Muški bolesnik s razinom IgG <2SD ispod prosjeka za dob, uredni broj T i B limfocita i barem jednim od: IgM >2 SD iznad prosjeka za dob; <i>Pneumocystis carinii</i> pneumonija u prvoj godini života; aplastična anemija uzrokovana parvovirusom; kriptosporidioza - proljev; sklerozantni kolangitis	Muški bolesnik s razinom IgG < 2SD ispod prosjeka za dob i svim niže navedenim: uredni broj T i B stanica i uredni T proliferativni odgovor na mitogene; uredni ili povišeni broj B stanica, ali bez specifičnih protutijela; jedna ili više infekcija ili komplikacija: ponavljane bakterijske infekcije u prvih 5 godina, <i>Pneumocystis carinii</i> infekcija u prvoj godini, neutropenija, kriptosporidioza (proljev), sklerozantni kolangitis, parvovirusna aplastična anemija; odsutnost CD40L na aktiviranim CD4+ T stanicama metodom vezanja slobodne CD40 molekule ili anti-CD40L monoklonskih protutijela	Muški bolesnik s razinom IgG <2 SD ispod prosjeka za dob i jednim od: mutacija u genu <i>CD40L</i> majčini bratići, ujac i nećaci s potvrđenom dijagnozom XHIM	Isključni kriteriji: defekti aktivacije T limfocita (npr. defekt ekspresije CD69 ili CD25 nakon in vitro aktivacije T stanica) HIV Konatalna rubella Nedostatak MHC II Nedostatak CD4+ T stanica Izlaganje lijeku ili infekciji s poznatim utjecajem na imuni sustav
Ataxia-teleangiectasia (A-T)	Progresivni neurološki poremećaj; poteškoće u hodanju koncem prve godine, u kolicima do puberteta; teleangiektazije sklera i lica oko 4-8 g.; ponavljane dišne infekcije; 10-15% leukemije ili limfomi	Muški ili ženski bolesnik s progresivnom cerebelarnom ataksijom i barem jednim od: teleangiektazije očiju ili lica; IgA <2 SD ispod prosjeka za dob; α -fetoprotein >2 SD iznad prosjeka za dob; umnoženi kromosomski lomovi nakon izlaganja zračenju	Muški ili ženski bolesnik s progresivnom cerebelarnom ataksijom i barem 3 kriterija od: teleangiektazije očiju ili lica; IgA <2 SD ispod prosjeka za dob; α -fetoprotein >2 SD iznad prosjeka za dob; zračenjem umnoženi kromosomski lomovi u kulturi stanica	Muški ili ženski bolesnik sa, ili zračenjem induciranim umnažanjem kromosomskih lomova u kulturi stanica, ili progresivnom cerebelarnom ataksijom, koji ima relevantne mutacije u oba alela <i>ATM</i> .	Diferencijalna dijagnoza: Nijmegenski sindrom kromosomskih lomova
Wiskott-Aldrichov sindrom (WAS)	Kongenitalna trombocitopenija i mikrotrombocitopatija; krvavi proljev, ekcem, otitis, sinuitis (herpes, EBV), IgM ↓, IgE i IgA ↑; s vremenom pad broja i funkcije T stanica; autoimune (glomerulonefritis, vaskulitis, hemolitička anemija) i maligne bolesti (leukemija, limfom, tumor mozga povezan s EBV infekcijom); neki bolesnici imaju blažu trombocitopeniju, bez drugih ispada.	Muški bolesnik <70×10 ⁹ /L malih trombocita; ili, muški bolesnik splenektomiran zbog trombocitopenije i barem jednim od: ekcem; slab humoralni odgovor na polisaharidne antigene; ponavljane bakterijske ili virusne infekcije; autoimune bolesti; limfom, leukemija, tumor mozga	Muški bolesnik kongenitalnom trombocitopenijom (<70×10 ⁹ /L) malim trombocitima i barem jednim od: ekcem; slab humoralni odgovor na polisaharidne antigene; ponavljane bakterijske ili virusne infekcije; autoimune bolesti; limfom, leukemija, tumor mozga	Muški bolesnik s kongenitalnom trombocitopenijom (<70×10 ⁹ /L) malim trombocitima i barem jednim od: mutacija gena <i>WASP</i> ; odsutna mRNA za <i>WASP</i> u northern blotu limfocita; odsutan <i>WASP</i> protein u limfocitima; majčini bratići, ujac i naćaci s trombocitopenijom i mikrotrombocitopatijom	

Tablica 1.

Dijagnostički kriteriji najvažnijih imunodeficijencija (5,6). Vidjeti na Internet adresi: <http://esid.org>

Table 1.

Diagnostic criteria for some of the more important immunodeficiencies (5, 6). See at: <http://esid.org>

Bolest	Klinički spektar	Moguća dijagnoza	Vjerojatna dijagnoza	Konačna dijagnoza	Napomene
Spolno vezani limfoproliferativni sindrom (XLP)	Obično asimptomatski tijekom do EBV infekcije: fulminantni hepatitis (60%, u male djece), Hodgkin i non-Hodgkin limfomi (30%), i/ili imunodeficijencija s IgG ↓ i NK funkcija ↓ (30%, veća djeca); rijetki hemofagocitni sindrom; infaustna prognoza, preživi <5% (hepatitis), do 50% (IgG ↓).	Muški bolesnik koji umre, ili dobije limfom, Hodgkinovu bolest, imunodeficijenciju, aplastičnu anemiju ili limfohistiocitni poremećaj, nakon akutne EBV infekcije.	Muški bolesnik koji umre, ili dobije limfom, Hodgkinovu bolest, imunodeficijenciju, aplastičnu anemiju ili limfohistiocitni poremećaj nakon akutne EBV infekcije + majčini bratići, ujaci ili nećaci s anamnezom sličnih dijagnoza nakon akutne EBV infekcije.	Muški bolesnik s limfomom, Hodgkinovom bolešću, smrtnom EBV infekcijom, imunodeficijencijom, aplastičnom anemijom ili limfohistiocitnim poremećajem koji ima mutaciju u <i>SH2D1A/SAP/DSHP</i> .	
Obična varijabilna imunodeficijencija (CVID)	Dijagnoza većinom u 2.-4. desetljeću, nakon recidivnih pneumonija. Bakterijske, virusne, gljivične i parazitske infekcije. IgM uredan u 1/2 slučajeva. B stanice uredne, ili ↓. Abnormalni broj i funkcija T stanica. Oko 50% ima autoimune bolesti; malignomi ↑.	Muški ili ženski bolesnik s razinom >2 SD ispod prosjeka za dob jednog od imunoglobulinskih razreda (G, A, M) i svim navedenim: početak s > 2 g; izohemaglutinini odsutni i/ili slab odgovor na cjepiva; isključeni drugi uzroci hipogamaglobulinemije	Muški ili ženski bolesnik s razinom >2 SD ispod prosjeka za dob u dva imunoglobulinska razreda (G, A, ili M) i svim navedenim: početak s >2 g. odsutni izohemaglutinini i/ili slab odgovor na cjepiva; isključeni drugi uzroci hipogamaglobulinemije		
Nedostatak IgA	Umnožene gornje dišne infekcije, alergije i autoimuni poremećaji. Često asimptomatski, neki imaju stalne ili ponavljane infekcije, neki s vremenom dobiju CVID.	Muški ili ženski bolesnik >4 g., IgA >2 SD ispod prosječne razine za dob, uredna razina IgG i IgM, isključeni drugi uzroci hipogamaglobulinemije.	Muški ili ženski bolesnik >4 g., IgA <0,07 g/L, uredna razina IgG i IgM, ostali uzroci hipogamaglobulinemije isključeni. Imaju uredan odgovor na cjepiva.		

LITERATURA

- Centers for Disease Control and Prevention. Applying public health strategies to primary immunodeficiency diseases: a potential approach to genetic disorders. MMWR 2004; 53 (No. RR-1): 1-29.
- Chapel H, Geha R, Rosen F, for the IUIS PID Classification Committee. Primary immunodeficiency diseases: an update. Clin Exp Immunol 2003; 132: 9-15.
- Puck JM. Primary immunodeficiency diseases. JAMA 1997; 278: 1835-41.
- Centers for Disease Control and Prevention. Applying public health strategies to primary immunodeficiency diseases: a potential approach to genetic disorders. MMWR 2004; 53 (No. RR-1): 1-29.
- Wetmur JG. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. Crit Rev Biochem Mol Biol 1991; 26: 227-259.
- Taylor G. Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphism in DNA. CRC Press, Boca-Raton, New York, 1996.
- Nollau P, Wagener C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. Clin Chem 1997; 43 (7): 1114-28.
- Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Clin Immunol 93:190-197, 1999.
- Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. European Society for Immunodeficiencies - Newsletter 10, April 2000. (Najnovije vidjeti na Internet adresi European Society for Immunodeficiencies: <http://esid.org>).
- Ochs HD, Smith CIE, Puck JM (ur.). Primary immunodeficiency diseases. New York - Oxford: Oxford University Press, 1999.
- Buckley RH, Fischer A. Bone marrow transplantation for primary immunodeficiency diseases. U: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM (ur.). Primary immunodeficiency diseases. New York - Oxford: Oxford University Press, 1999; 459-475.
- Bartolome J, Porta F, Lafranchi A, Rodriguez-Molina JJ, Cela E, Cantalejo A, Fernandez-Cruz E, Gomez-Pineda A, Ugazio AG, Notarangelo LD, Gil J. B cell function after haploidentical in utero bone marrow transplantation in a patient with severe combined immunodeficiency. Bone Marrow Transplant. 2002; 29 (7): 625-8.
- Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. N Engl J Med 2002; 346 (16): 1185-93.
- Richter D, Conley ME, Rohrer J, Myers LA, Zahradka K, Kelečić J, Sertić J, Stavljenić-Rukavina A. A contiguous deletion syndrome of X-linked agammaglobulinemia and sensorineural deafness. Pediatr Allergy Immunol 2001; 12: 107-111.
- Richter D, Conley ME, Rohrer J, Myers LA, Zahradka K, Kelečić J, Sertić J, Stavljenić-Rukavina A. A contiguous deletion syndrome of X-linked agammaglobulinemia and sensorineural deafness. Pediatr Allergy Immunol 2001; 12: 107-111.
- Lederman HM, Winkelstein JA. X-Linked Agammaglobulinemia: An Analysis of 96 Patients. Medicine 1985; 64: 145-156.
- Richter D, Labar B, Batinić Drago, Kelečić J, Rajić Lj, Tješić-Drinković D, Mršić M, Hitrec V, Sertić J, Novak M. Dilemmas in post-transplant X-scid. 8th Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, ESID '98, Rhodes (Greece), 8-11 October 1998. Molecular Immunol 1998; 35 (11-12): 779.
- Fieschi C, Dupuis S, Catherinot E, Feinberg J, Bustamante J, Breiman A, Altare F, Baretto R, Le Deist F, Kayal S, Koch H, Richter D, Brezina M, Aksu G, Wood P, Al-Jumaah S, Raspall M, Da Silva Duarte AJ, Tuerlinckx D, Virelizier JL, Fischer A, Enright A, Bernhoft J, Cleary AM, Vermylen C, Rodriguez-Gallego C, Davies G, Blutters-Sawatzki R, Siegrist CA, Ehlayel MS, Novelli V, Haas WH, Levy J, Freiherst J, Al-Hajjar S, Nadal D, De Moraes Vasconcelos D, Jeppsson O, Kutukculer N, Freceirova K, Caragol I, Lammass D, Kumararatne DS, Abel L, Casanova JL. Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor beta1 deficiency: medical and immunological implications. J Exp Med. 2003; 197 (4): 527-35.

Summary

THE ROLE OF GENOMIC ANALYSIS IN PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES

D. Richter, J. Sertić

Primary immunodeficiency diseases are a group of heritable disorders of the immune system that affect antigen recognition and/or removal. The clinical picture is dominated by severe, chronic and unusual (opportunistic, vaccinal) infections. Approximately 100 separate PI diseases have been described, but >90% of cases are probably caused by <20 established entities. The identification of many genes responsible for primary immunodeficiencies has provided a new perspective in evaluating these disorders: 1) clarifying the clinical and laboratory findings that are most consistently associated with a specific gene; 2) demonstrating the spectrum of clinical severity seen in a particular disorder; and, 3) showing that not all of the patients with identical clinical and laboratory findings have mutations in the same gene. The diagnostic criteria based on molecular analysis data are divided into three categories: definitive, probable and possible. Definitive diagnosis requires evidence of gene mutation, absence of specific mRNA or gene protein product and is assumed to have a greater than 98% probability to hold true after 20 years. Patients with a probable diagnosis are assumed to have a greater than 85% probability of stable diagnosis. They display all of the clinical and laboratory characteristics of a particular disorder, but miss a documented genomic and/or protein abnormality. Patients with a possible diagnosis are those who have some but not all of the characteristic clinical or laboratory findings and require adequate molecular/genomic confirmation in the course of time. It is important to do every effort to make a definitive diagnosis as this clarifies the disease mechanism and possible associated disorders, allows adequate therapy including gene therapy, precise genetic counselling, prenatal anticipation and in utero intervention (hematopoietic stem cell infusion). The clinical phenotype continues to defy our perception of the role of genes in health and disease and remains the clue to defining the relevance of genomic analysis results.

Descriptors: PRIMARY IMMUNODEFICIENCY, MOLECULAR DIAGNOSIS, GENOMIC DIAGNOSIS