

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA IMUNODEFICIJENCIJSKIH SINDROMA

DRAGO BATINIĆ*

Laboratorijske pretrage su ključne za procjenu imunološkog statusa i igraju glavnu ulogu u dijagnostici, liječenju i praćenju bolesnika s imunodeficijenijom. Mogućnost procjene imunološkog sustava napredovala je zajedno s razumijevanjem pojedinosti normalnog imunološkog odgovora i razvojem suvremenih laboratorijskih oruđa. Međutim, sve veći broj laboratorijskih testova treba upozoriti kliničare i laboratorijske imunologe na odabir najprikladnijih pretraga u osoba sa sumnjom na specifičnu imunodeficijeniju. Stoga procjenu funkcije imunološkog sustava treba započeti testovima pretraživanja, a na temelju dobivenih podataka testiranje treba proširiti sofisticiranijim i skupljim pretragama. Konačno, napredak laboratorijske tehnologije omogućit će još bolje razumijevanje imunopatogeneze specifičnih imunodeficijenija, a time postaviti nove standarde i zahtjeve pred rutinski klinički laboratorij.

Deskriptori: IMUNODEFICIJENCIJE, LIMFOCITI, LABORATORIJSKA IMUNOLOGIJA, DIJAGNOSTIČKA IMUNOLOGIJA

UVOD

U čovjeka se procjena imunološkog sustava, u pravilu, temelji na laboratorijskom ispitivanju *in vitro* (1-3). Za pretpostaviti je da će razvoj imunologije i novih tehnologija omogućiti još precizniji uvid u funkcioniranje imunološkog sustava, a time i u mehanizme poremećaja imunološkog sustava. No, važno pitanje u tom procesu jest kako složene laboratorijske testove prenijeti u rutinsku kliničko-laboratorijsku praksu. Drugim riječima, sve veći broj složenih imunoloških testova nameće potrebu za što racionalnijim odabirom testova koji će osigurati odgovarajuću informaciju.

Najvažnije indikacije za laboratorijsko ispitivanje imunološkog sustava jesu stanja koje karakterizira poremećaj u prepoznavanju ili odstranjenju tuđih antigena, a koje nazivamo imunodeficijenijama ili imunodeficijenijskim

sindromima (1-2). U odnosu na uzrok, imunodeficijenijski sindromi dijele se na primarne (urođene) i sekundarne (stečene), a oba dovode do sličnih kliničkih stanja koja se očituju rekurentnim ili kroničnim infekcijama.

U odnosu na primarne, sekundarne imunodeficijenije su znatno učestalije, a nastaju kao posljedica teške pothranjenosti, zaraze (npr. AIDS, ospice, parazitske bolesti), autoimunih bolesti (npr. sistemskog lupusa eritematodesa) i primjene agresivnih oblika liječenja (kortikosteroidima, imunosupresivskim lijekovima, citostaticima i zračenjem, transplantacijom tkiva i organa) (4-5).

Do danas je opisano više od 100 primarnih imunodeficijenijskih sindroma, od kojih su neki nađeni u svega nekoliko bolesnika (6). To su relativno rijetke bolesti čija incidencija iznosi 1:300 do 1:500000 u općoj populaciji. Najčešće se otkriju u novorođenačkoj i dječjoj dobi (60%), dok se preostale otkriju tek u odrasloj dobi. Premda su rijetki, primarni imunodeficijenijski sindromi su važni zbog sljedećih razloga:

- brza i adekvatna dijagnoza bolesti može spasiti život ili znatno unapri-

rediti kvalitetu života oboljelog djeteta;

- poznavanje genske prirode poremećaja imunološkog sustava omogućuje prenatalnu dijagnostiku i doprinosi planiranju obitelji;
- omogućavaju upoznavanje složenih mehanizama imunoregulacije.

Imunodeficijenije nastaju zbog poremećaja nespecifične ili specifične imunosti, a u odnosu na izvršni krak imunološkog odgovora, poremećaj može nastati na razini stanične imunosti, humoralne imunosti ili zahvaća oba kraka imunološkog odgovora (mješovite imunodeficijenije) (1-4). Na razini nespecifične imunosti oštećenje zahvaća fagocite, NK-stanice ili sustav komplementa, dok na razini specifične imunosti poremećaj dovodi do smanjenog broja ili funkcije limfocita T ili B, odnosno do smanjenog ili potpunog izostanka izlučivanja protutijela (1-4).

S kliničkog stajališta, imunodeficijenije se očituju zarazama rekurentnog ili kroničnog tijeka, otpornošću na antimikrobnu terapiju, specifičnom vrstom uzročnika i često atipičnom kliničkom slikom. Osoba pod povećanim

*Zavod za imunologiju
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku
Klinički bolnički centar Zagreb - Rebro

Adresa za dopisivanje:
Prof. dr. Drago Batinić
Klinički bolnički centar Zagreb - Rebro
10000 Zagreb, Kišpatićeva 12
E-mail: drago.batinic@zg.htnet.hr

rizikom za razvoj zarazne bolesti naziva se kompromitiranim domaćinom (engl. *compromised host*), a osoba s oštećenim i nedostatnim imunostim odgovorom naziva se *imunokompromitiranim* domaćinom. Imunodeficijencije se, konačno, povezuju i s nastankom autoimunih bolesti, alergija, hematoloških poremećaja, malapsorpcijskog sindroma i neoplazmi limfnog tkiva

DIJAGNOSTIKA PRIMARNIH IMUNODEFICIJENCIJSKIH SINDROMA

Opća načela

Dijagnoza primarnih imunodeficijenzijskih sindroma jest od posebnog značaja tijekom prve godine života (1-2). Naime, ako se ne dijagnosticiraju i ne liječe na vrijeme, primarni imunodeficijenzijski često završavaju letalno. U cilju odgovarajuće laboratorijske dijagnostike, posebnu pažnju treba usmjeriti na anamnezu i kliničku sliku. Podaci važni za dijagnozu uključuju dob u kojoj je došlo do pojave prvih znakova bolesti, rast i razvoj djeteta, ishod cijepljenja živim mikroorganizmima, učestalost, težina i vrst infekcija, i sl. Obiteljska anamneza je važna jer može ukazati na dijagnozu imunodeficijencije (npr. podatak o iznenadnoj smrti dojenčadi u obitelji, konsanguinitet, i sl.). Liječnik mora poduzeti kliničkolaboratorijska ispitivanja kako bi utvrdio vrstu i opseg oštećenja i locirao poremećaj na staničnoj i molekularnoj razini. Pored ispitivanja, kliničkolaboratorijska obrada treba uključiti i članove obitelji. Budući da ne postoji jedinstveni test kojim bi se utvrdili poremećaji imunostnog sustava, to je obično potrebno učiniti nekoliko pretraga u svim slučajevima sumnje na imunodeficijenciju.

Vrsta zaraznog uzročnika i zahvaćeni organi obično daju korisne smjernice u otkrivanju naravi imunološkog poremećaja (1-2). Na primjer, osobe s nedostatnim humoralnim odgovorom imaju povećanu sklonost zarazi inkapsuliranim piogenim bakterijama (*Staphylococcus sp.* i *Streptococcus pneumoniae*) i enterovirusima. Nasuprot, osobe s nedostatnom funkcijom limfocita T ponajčešće pate od virusnih i gljivičnih infekcija,

a česte su i zaraze s *Pneumocystis sp.* Drugi važni klinički znaci imunodeficijencija jesu kronični proljev, malapsorpcija, a ponekad i malnutricija, pa se u dijagnostici moraju isključiti autoimune i kronične upalne bolesti (npr. glutenska enteropatija). Najčešći uzročnici navedenih simptoma jesu *Giardia*, *Cryptosporidium* i rotavirusi. U bolesnika s primarnom imunodeficijencijom pažnju treba usmjeriti i na opći status (zastoj u rastu), limfne čvorove (koji nedostaju ili su povećani), organomegaliju, osip i kožne promjene, usnu šupljinu, kao i na hematološke nalaze (na primjer, trombocitopenija je važan nalaz u dijagnostici Wiskott-Aldrichevog sindroma).

Laboratorijska dijagnostika

U načelu, imunološke pretrage u rutinskoj praksi možemo podijeliti na testove pretraživanja ("*screening*") (Tablica 1) i na specijalne testove (Tablica 2), a u odnosu na ispitivano svojstvo na fenotipske, genotipske i funkcijske pretrage (7-8). Za velik broj imunoloških pretraga, posebice funkcijskih testova limfocita, još uvijek nema "zlatnog standarda", pa se stoga izvode u specijaliziranim centrima i laboratorijima (8). Laboratorijsku dijagnostiku imunodeficijencija treba započeti testovima pretraživanja (engl. *screening*) humoralne i stanične imunosti (7-8). Na osnovu rezultata testova pretraživanja liječnik indicira specijalističke pretrage za ispitivanje humoralne

i stanične imunosti u cilju utvrđivanja razine i opsega oštećenja imunostnog sustava. Konačno, biokemijske i molekularno-genetičke analize definiraju poremećaj na subcelularnoj i molekularnoj razini, čime se ujedno postavlja i konačna dijagnoza bolesti (1-4).

Pretraživanje humoralne imunosti

Glavni efektori humoralne imunosti jesu protutijela čiju funkciju dopunjuje "*komplementira*" sustav komplementa. Protutijela su proizvod plazma-stanica, krajnje diferenciranih limfocita B.

Pretrage humoralne imunosti nesumnjivo su pouzdanije i manje podložne interpretaciji nego li pretrage stanične imunosti, posebice kad je riječ o mjerenju razine serumskih imunoglobulina kao mjere funkcije limfocita B (7-8). Pretraživanje humoralne imunosti uključuje sljedeće testove:

- elektroforezu serumskih proteina;
- određivanje razine imunoglobulinskih razreda (IgA, IgG i IgM) u serumu;
- određivanje titra izohemaglutinina;
- određivanje titra specifičnih protutijela;
- ispitivanje funkcije komplementa (Tablica 1) (2, 7, 8).

Tablica 1.

Testovi za pretraživanje "*screening*" primarnih imunodeficijenzijskih sindroma (1, 3, 8)

Table 1

Screening test for primary immunodeficiency syndromes (1, 3, 8)

Pretraga	Mjerni parametar	Izvršni krak
Leukociti i diferencijalna krvna slika	apsolutni broj neutrofilnih granulocita apsolutni broj limfocita apsolutni broj trombocita	granulociti limfociti (T i B) medijatori
Komplement	ukupna hemolitička aktivnost (CH50) razina C3, C4 i C1-inhibitora	komplement/ humoralni
Elektroforeza proteina	γ-globulini (sveukupna protutijela)	limfociti B
Imunoglobulini u serumu	IgA IgG IgM	limfociti B
Razina funkcijskih protutijela	protutijela na krvne grupe protutijela na antigene cjepiva	limfociti B
Kožni test	reakcija kasne preosjetljivosti (promjer reakcije, mm)	limfociti T

Tablica 2.
Specijalni testovi za dijagnostiku primarnih imunodeficiencijskih sindroma (1, 3, 8)

Table 2
Special diagnostic tests for primary immunodeficiency syndromes (1, 3, 8)

Testovi za limfocite B	Testovi za limfocite T i NK-stanice
Relativni i apsolutni broj limfocita B: <ul style="list-style-type: none"> • svi limfociti B (CD19+) 	Relativni i apsolutni broj limfocita T: <ul style="list-style-type: none"> • svi limfociti T (CD3+) • pomagački limfociti T (CD3+CD4+) • citotoksični limfociti T (CD3+CD8+) • omjer CD4/CD8 • NK-stanice (CD3-CD16+56+)
Proizvodnja protutijela na polisaharidne antigene (npr. pneumokokni polisaharid)	Aktivacija limfocita i mjerenje izražaja CD154 na CD4+ limfocitima T
In vitro proizvodnja protutijela inducirana: <ul style="list-style-type: none"> • mitogenicima (PWM) • proteinom A 	Proliferacija limfocita <i>in vitro</i> inducirana: <ul style="list-style-type: none"> • mitogenicima (PHA, ConA i PWM) • anti-limfocitnim protutijelima (CD3) • antigenima (PPD, tetanusni toksoid) • alogeničnim stanicama (MLR) *
	Testovi citotoksičnosti: <ul style="list-style-type: none"> • NK-aktivnost • testovi citotoksičnosti limfocita T
Određivanje razine podrazreda IgG	Određivanje citokina (Th1 vs. Th2): <ul style="list-style-type: none"> • u limfocitima • u nadtalogu podraženih limfocita
Mutacije gena: <ul style="list-style-type: none"> • Agamaglobinemija (kinaza Btk, IGHM, CD79a i CD179b) • združena varijabilna imunodef. (ICOS) • hiper-IgM (AICDA, UNG) 	Biokemijska analiza molekula: <ul style="list-style-type: none"> • PNP i ADA u lizatu eritrocita Mutacije gena: <ul style="list-style-type: none"> • SCID (IL-2RG, JAK3, IL7RA, RAG1, RAG2)

* mixed lymphocyte reaction (MLR) = kultura pomiješanih limfocita

Elektroforeza serumskih proteina

Protutijela su sadržana u frakciji γ -globulina (imunoglobulina), a njihova serumska razina ovisi o dobi te o odnosu između sinteze i potrošnje ili gubitka. Treba napomenuti da elektroforeza serumskih proteina ne može kvantificirati pojedinačne imunoglobulinske razrede.

Mjerenje razine imunoglobulinskih razreda

Mjerenje koncentracije serumskih imunoglobulinskih razreda izvodi se u tekućoj fazi (npr. laserskom nefelometrijom) ili u polučvrstom mediju (npr. radijalnom imunodifuzijom) (7-8). Druge tehnike uključuju radioimunotest i enzimski imunotest, posebice kada se

mjeri razina IgE i IgD. Neto koncentracija imunoglobulina u serumu ovisi o više činitelja, kao što su dob, stupanj sinteze, tkivne razdiobe, potrošnje i gubitka imunoglobulina. Stoga se pri tumačenju nalaza moraju uzeti u obzir normalne vrijednosti za lokalno stanovništvo, ali i različiti metabolički činitelji, odnosno bolesti koje mogu biti povezane s gubitkom proteina. Istovremeno mjerenje razine drugih proteina u serumu (npr. albumina) s pomoću elektroforeze važno je za procjenu sveukupnog gubitka serumskih proteina i imunoglobulina (1, 8).

Mjerenje titra izohemaglutinina

Mjerenje titra izohemaglutinina anti-A i anti-B služi kao pokazatelj proizvodnje "prirodnih" protutijela razreda IgM. Ta se protutijela sintetiziraju u svih osoba (osim u onih krvne grupe AB), a nastaju kao reakcija na ubikvitarne bakterijske antigene čija građa nalikuje polisaharidima antigena krvnih grupa (križna reakcija). Osoba krvne grupe A razvija protutijela anti-B, osoba grupe B razvija anti-A, a osoba krvne grupe O razvija anti-A i anti-B. Izohemaglutinini se sintetiziraju u prvim godinama života, pa do treće godine većina (98%) zdrave djece krvnih grupa A, B i 0 imaju titar izohemaglutinina najmanje 1:16 (3, 7, 8). Manjak izohemaglutinina pokazatelj je oštećenja humoralnog imuniteta, čak i u one djece koja mogu imati uredan nalaz serumskih imunoglobulina (npr. u djece oboljele od Wiskott-Aldricheva sindroma) (1).

Mjerenje specifičnog imunološkog odgovora nakon imunizacije

Stvaranje protutijela na specifične antigene najbolji je pokazatelj sveukupne B-stanične funkcije (1, 3, 8). Radi se o ispitivanju titra specifičnih protutijela razreda IgG prije i nakon imunizacije antigenima cjepiva, pri čemu se istodobno ispituje i aferentni (prepoznavanje) i eferentni krak (proizvodnja protutijela) humoralnog odgovora. Pri tome se treba strogo pridržavati pravila da se djetetu sa sumnjom na imunodeficienciju *nikada* ne daju cjepiva od živih mikroorganizama (BCG, polio, morbili). Od *T-ovisnih* antigena najčešće se rabe cjepiva protiv tetanusa, difterije i pertusisa, dok se za procjenu odgovora na *T-neovisne* antigene primjenjuju polisaharidi meningokoka i pneumokoka. Normalni humoralni odgovor očituje se povećanjem titra specifičnog protutijela nakon dva tjedna od primjene proteinskih cjepiva (npr. difterija i tetanus), odnosno tri tjedna od primjene polisaharidnih cjepiva. Međutim, djeca mlađa od 2 godine obično vrlo slabo odgovaraju na polisaharidna cjepiva. Bolesnici s agamaglobulinemijom neće razviti većinu (ili sve) vrste protutijela, oni s izdvojenim manjkom IgG₂ mogu imati teškoća u sintezi protutijela na polisaharide, dok će bolesnici s manjkom

IgA ili prolaznom hipogamaglobulinemijom imat normalni odgovor na cjeviva (1). Bolesnici koji su primili nadomjesnu terapiju imunoglobulinima ne mogu se cijepiti na gore navedeni način, već se mogu cijepiti bakteriofagom (obično s ΦX174) (1).

Analiza komplementa

Razina komplementa u serumu određuje se testom ukupne hemolitičke aktivnosti seruma (CH_{50}) (engl. *total hemolytic complement* - CH_{50}) (7-8). Testom se ispituje klasični put aktivacije komplementa, pa je stoga koristan za pretraživanje većine nedostatnosti sustava komplementa. Vrijednost $CH_{50} = 0$ nalazi se pri manjku komponenti C1-C8, dok se u manjku C9 vrijednosti CH_{50} kreću od 25% do 50% normalne vrijednosti. Test CH_{50} neće otkriti manjak properdina ili faktora D (tada je potrebno učiniti specijalni test - APH_{50}). Manjak faktora I ili H udružen je s povećanom potrošnjom C3 i stoga sniženom vrijednosti CH_{50} . Manjak C1-inhibitora udružen je sa sniženom razinom C4.

Pretraživanje stanične imunosti

Za pretraživanje stanične imunosti rabe se dvije osnovne pretrage - krvna slika i kožno testiranje *in vivo* (Tablica 1) (1, 3, 7).

Krvna slika

Osnovna pretraga za procjenu stanične imunosti *in vitro* jest krvna slika koja mora sadržavati relativni i apsolutni broj limfocita, neutrofila i trombocita, kao i morfološke karakteristike stanica periferne krvi (npr. broj i veličinu granula u neutrofilima, oblik i veličinu trombocita i sl.) (1). U ocjeni imunodeficijencije treba se voditi činjenicom da apsolutni broj leukocita, neutrofila i limfocita također ovisi o dobi ispitanika. Na primjer, broj limfocita u dojenačkoj dobi je veći nego u drugim dobnim skupinama, pa u dobi od 9 mjeseci (kada se i očituju stanične imunodeficijencije) donja granica normalnog broja limfocita iznosi $4,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ (1, 3). Smanjen broj limfocita može biti izdvojeni nalaz ili može biti udružen s kvantitativnim poremećajem drugih

leukocita, kao što je npr. limfopenija s eozinofilijom ili limfopenija s trombocitopenijom.

Kožni test *in vivo*

Za funkcijsku procjenu stanične imunosti *in vivo* primjenjuje se kožno testiranje po tipu odgođene (kasne) preosjetljivosti (1, 3). Sastoji se od intradermalne injekcije antigena, a reakcija se očitava nakon 48 i 72 sata. Pozitivnom reakcijom smatra se nalaz induracije minimalne veličine $5 \times 5\text{mm}$ na mjestu injekcije antigena. Tim se testom ispituje funkcija *memorijskih limfocita T*, tj. reakcija na antigene zaraznih klica s kojima je osoba prethodno došla u dodir prirodnim putem ili cijepljenjem (tetanusni toksoid, PPD, antigeni *Candidae* ili mumpsa). Stoga se ti antigeni nazivaju i anamnestičkim (engl. *recall*), a reakcija koju induciraju naziva se *anamnestički* odgovor. Negativan nalaz ne znači uvijek manjak limfocita T, već se može raditi o disfunkciji "anergiji" limfocita T koja se viđa u različitim patološkim stanjima. Za dojenčad i malu djeca ne preporuča se kožno testiranje zbog visoke učestalosti lažno-negativnih odgovora, tj. nedovoljne prethodne izloženosti djece navedenim

antigenima (1, 3, 7). Preporuka je WHO da se testiranje s pomoću sintetskog spoja DNCB više ne izvodi, budući da je taj spoj mutagen i uzrokuje nekrozu tkiva.

Specijalni testovi za dijagnostiku primarnih imunodeficiencijskih sindroma

Specijalni testovi za dijagnostiku imunodeficiencijskih sindroma indicirani su nakon što su poznati rezultati testova pretraživanja, a nikako prije njih. Specijalne testove za procjenu broja i funkcije limfocita T i B prikazuje tablica 2.

Relativni i apsolutni broj limfocitnih subpopulacija

Osnovna metoda za određivanje relativnog i apsolutnog broja pojedinih razreda i podrazreda limfocita u perifernoj krvi je imunološka fenotipizacija limfocita s pomoću monoklonskih protutijela i protočne citometrije (1, 3, 7, 8). Imunološka fenotipizacija leukocita temelji se na otkrivanju membranskih leukocitnih diferencijacijskih antigena (LDA) iz sustava CD-klasifikacije (engl. *clusters of differentiation*) s pomoću specifičnih monoklonskih protutijela. Danas

Tablica 3.

Razdioba limfocita periferne krvi: relativni i apsolutni brojevi limfocitnih subpopulacija periferne krvi (9)

Table 3

Distribution of peripheral blood lymphocytes: relative and absolute numbers of peripheral blood lymphocytes subpopulations (9)

Limfocitne subpopulacije	Udio/ broj	Djeca * (medijan, raspon)	Odrasli * (medijan, raspon)
Limfociti T (CD3+)	% $\times 10^3/\mu\text{L}$	64 (54-80) 2,44 (1,32-3,30)	73 (60-83) 1,49 (0,88-2,55)
Pomagački limfociti T (CD3+CD4+)	% $\times 10^3/\mu\text{L}$	36 (25-46) 1,11 (0,62-2,45)	43 (30-55) 0,82 (0,56-1,40)
Citototoksični limfociti T (CD3+CD8+)	% $\times 10^3/\mu\text{L}$	22 (15-42) 0,81 (0,39-1,10)	28 (16-39) 0,53 (0,22-0,95)
Omjer CD4/CD8	omjer	1,50 (0,6-3,1)	1,52 (0,9-3,4)
Limfociti B (CD3-CD19+)	% $\times 10^3/\mu\text{L}$	22 (9-37) 0,54 (0,270-2,06)	8,0 (4-14) 0,15 (0,06-0,46)
NK-stanice (CD3-CD16+CD56+)	% $\times 10^3/\mu\text{L}$	12 (5-20) 0,32 (0,19-0,74)	19 (10-31) 0,35 (0,18-0,60)

* djeca, 1-15 god.;

* odrasli, dob >15 god.

Tablica 4.
Cirkulirajući limfociti B (3)

Table 4
Circulating lymphocytes B (3)

Vrsta limfocita B	Membranski biljezi *
Nezreli	CD19+mIgM+
Zreli	CD19+mIgM+mIgD+
Memorijski	CD19+mIgM+mIgD+CD27+
Memorijski s prekopčanim imunoglobulinskim razredom	CD19+ mIgG+ ili mIgA+ ili mIgE+

* membranski imunoglobulin ima funkciju receptora za antigen na limfocitu B

se obično rabi dvostruko ili trostruko bojenje stanica, tj. istodobna analiza dva ili tri biljega na stanicama. Na taj se način može analizirati ne samo udio (broj) pojedine skupine limfocita, već i njihov stupanj diferencijacije ili aktivacije.

Paleta monoklonskih protutijela koja se rabi u dijagnostici ovisi o indikaciji (1, 3). Osnovni panel za imunološku fenotipizaciju limfocita prikazan je u tablici 3. Njime se otkriva relativni i apsolutni broj limfocita T i T-limfocitnih subpopulacija (pomagačkih i citotoksičnih), limfocita B i NK-stanica u perifernoj krvi, a katkada i u koštanoj srži.

Pri tumačenju i prikazivanju rezultata limfocitnih subpopulacija treba se služiti referentnim vrijednostima. Stoga liječnik treba poznavati raspone normalnih vrijednosti vlastitoga kliničkog laboratorija (Tablica 3), a u znanstvenim studijama treba formirati vlastite kontrolne skupine (9). Udio i apsolutni broj limfocitnih subpopulacija u krvi ovisi o dobi i spolu, pa za djecu i starije osobe uvijek treba tražiti primjerene referentne raspone, uključujući one iz velikih serija ispitanika iz literature (10). Pri tome treba imati na umu da je *apsolutni* broj stanica važniji podatak nego njihov udio u zajedničkoj lozi. Praćenje limfocitnih subpopulacija pokazalo se vrijednim za dijagnostiku specifičnih imunodeficit (npr. parcijalnog Di Georgeovog sindroma) i praćenje bolesnika s imunodeficitom, posebice u kontekstu specifične terapije (5, 11).

U pojedinim slučajevima potrebno je analizirati dodatne biljege limfocita kako bi se točnije utvrdio njihov imu-

nofenotip, a time potvrdila ili isključila dijagnoza primarne imunodeficijencije. Zrelost i stupanj diferencijacije limfocita B ispituje se na temelju izražaja razreda antigenskog receptora (IgM, IgD, IgG ili IgA) i biljega CD27 (Tablica 4) (3). Imunofenotip limfocita T može ukazati na specifični poremećaj: nezreli CD4+C-D8+ limfociti T mogu se naći u perifernoj krvi bolesnika s teškom združenom imunodeficijencijom, dok neizražaj biljega CD43 na limfocitima T karakterizira Wiskott-Aldrichev sindrom (Tablica 5) (1, 3).

Funkcijski testovi limfocita

Postoje brojni testovi limfocitne funkcije, no oni su, u načelu, složeni i nestandardizirani. Stoga se u svom radu liječnik treba osloniti na što točniju re-

produkciju rezultata vlastitog laboratorija, a ne težiti "točnom" rezultatu (1, 8). Usporedbe s vlastitim laboratorijskim kontrolama, kao i korelacija s tijekom i ishodom bolesti posredno približuju razumijevanju uloge mjerene pojave u funkciji određenih stanica (12). Funkcijski testovi limfocita T uključuju mjerenje proliferacije limfocita, analizu citokina i imunoglobulina podraženih limfocita, i testove citotoksičnosti (1, 3, 7).

Od funkcijskih ispitivanja limfocita najčešće se izvodi test proliferacije limfocita *in vitro*, dok se složenije analize izvode u specijaliziranim laboratorijima.

Aktivacija i proliferacija limfocita *in vitro*

Limfociti se mogu aktivirati i potaknuti na poliklonsku proliferaciju *in vitro* primjenom nespecifičnih aktivatora (mitogenika, superantigena, forbol-estera i anti-limfocitnih protutijela), dok se aktivacija antigen-specifičnih receptora inducira "memorijskim" antigenima i alogeničnim molekulama HLA (tj. alogeničnim stanicama) (1, 3, 7, 12).

Mitogenici su poliklonski aktivatori limfocita, a najčešće se rabe lektini fitohemaglutinin (PHA), konkavalin A (ConA) i korovski mitogen (PWM). PHA i ConA služe za procjenu aktivacije limfocita T, a zahtijevaju prisutnost monocita za stimulaciju limfocita T.

Tablica 5.
Prošireni panel monoklonskih protutijela za imunološku fenotipizaciju limfocita u primarnim imunodeficijencijama (1, 3)

Table 5
The extended panel of monoclonal antibodies for immunologic phenotyping of lymphocytes in primary immunodeficiencies (1, 3)

Imunofenotip limfocita	Označava	Imunodeficijencija
CD4+CD8+	nezrele limfocite T	SCID *
CD4+CD38+	nezrele limfocite T	SCID
CD3+CD43-	neizražaj sijaloforina (CD43)	Wiskott-Aldrichev sindrom
CD3+/HLA-ABC-	neizražaj HLA-ABC	sindrom "golih" limfocita
CD20+HLA-DR-	neizražaj HLA-DR	sindrom manjka HLA-DR
CD4+CD45RO+	memorijske stanice (majčinske)	Omenov sindrom
CD4+CD45RA+	naivni limfociti T	X-vezana agamaglobulinemija

* engl. severe combined immunodeficiency, teška združena imunodeficijencija

Uobičajeni aktivatori limfocita B jesu PWM (učinak ostvaruje preko limfocita T) i stafilokokni protein A (SPA). Drugi nespecifični aktivatori limfocita jesu forbol-esteri (npr. PMA) i superantigeni, kao što je toksin toksičnog šoka (engl. *toxic shock syndrome toxin*, TSST). Forbol-esteri izravno aktiviraju protein-kinazu C (PKC), čime se zaobilazi početna faza aktivacije limfocita preko receptora. Superantigeni aktiviraju limfocite T tako da se izravno vežu za β -lanac T-staničnog receptora (TSR) i za molekulu II. razreda HLA na antigen-predodnim stanicama. Protutijela koja se rabe za nespecifičnu aktivaciju limfocita T uključuju protutijela na signalnu (CD3) i kostimulacijsku molekulu (CD28), kao i na različite adhezijske molekule (npr. CD2).

Nasuprot poliklonskim aktivatorima, antigeni podražuju samo one limfocite koji izražavaju specifične receptore za te antigene (1, 3, 8). Za mjerljivi odgovor limfocita T na antigene *in vitro* rabe se antigeni iz cjepiva, odnosno antigeni ubikvitarnih uzročnika, čime se ispituje memorijski odgovor limfocita. Stoga je testiranje antigenima manje učinkovito u dojenačkoj dobi i u malene djece. Najčešće se rabe tetanusni toksoid (TT), ekstrakt *Candida albicans*, tuberkulin (PPD) i streptolizin/streptodornaza.

Proliferacija limfocita na alogenične stanice u reakciji pomiješanih limfocita (engl. *mixed lymphocyte reaction*, MLR) je dodatna metoda za procjenu funkcije limfocita T. Zbog svoje relativne složenosti postupak nije u rutinskoj uporabi, već se obično izvodi u specijaliziranim centrima za transplantaciju krvotvornih matičnih stanica (1, 3, 12).

U procjeni stupnja aktivacije i proliferacije limfocita *in vitro* rabe se različite tehnike, što ovisi o veličini i opremljenosti laboratorija (1, 3, 7, 8). Tradicionalni postupak mjerenja proliferacije limfocita jest metoda ugradnje radioaktivno obilježenog timidina (^3H -thymidine) u DNA proliferirajućih limfocita. Umjesto ugradnje radioaktivnog timidina, danas su razvijene sljedeće tehnike:

- mjerenje ugradnje neradioaktivnog spoja brom-deoksiuridina (BrdU) s pomoću fluorescentnih anti-BrdU

protutijela i protočne citometrije;

- analiza sadržaja DNA protočnom citometrijom (mjeri se udio stanica u proliferaciji);
- mjeri se izražaj aktivacijskih biljega CD69 ili CD25 na limfocitima s pomoću protočne citometrije.

Treba napomenuti da se analizom izražaja aktivacijskih biljega (npr. CD69) na limfocitima podraženim kroz kraći period (4-6 sati) ne mjeri proliferacija limfocita, već samo početna faza, tj. aktivacija limfocita.

Analiza citokina i imunoglobulina podraženih limfocita

Za dokaz proizvodnje protutijela od strane podraženih limfocita B *in vitro* najčešće se rabi analiza nadtaloga kultura s pomoću enzimskog imunotesta (ELISA). Međutim, postupak se rijetko izvodi u rutinskom radu.

Citokini su glavni medijatori imunoloških stanica kojima se ostvaruje imunološki odgovor. Početni optimizam glede dijagnostičke vrijednosti mjerenja razine citokina u biološkim materijalima (npr. u krvi i likvoru) polako je nestao nakon što je pokazano da ta informacija u većini slučajeva nema veliku kliničku vrijednost (3). Ipak, u pojedinim oblicima imunodeficijencija i u istraživačke svrhe često se rabi mjerenje razine citokina podraženih limfocita *in vitro*. Pri tome se obično rabi ELISA za mjerenje izlučenih citokina u nadtalogu kultura podraženih limfocita (3, 7, 8), dok novije metode uključuju protočnu citometriju za mjerenje intracelularnih citokina i ELISPOT, metodu za imunocitokemijski dokaz proizvodnje citokina u pojedinom limfocitu (3). Tim se postupcima mogu otkriti funkcijski odjelci podraženih limfocita T: limfociti T_{H1} luče citokine (IFN- γ , TNF i IL-2) odgovorne za razvoj stanične imunosti, dok limfociti T_{H2} luče citokine (IL-4, IL-5, IL-10) odgovorne za sazrijevanje limfocita B i humoralne imunosti.

Mjerenje izražaja CD40-liganda (CD154) na limfocitima T

Tijekom aktivacije limfocita T dolazi do izražaja molekule CD154, liganda za molekulu CD40 na limfocitu B. Ta je stanična interakcija posebno važna, jer omogućuje imunosti odgovor na antigene ovisne o timusu (tj. o limfocitima T). Veza između CD40-liganda na limfocitu T i CD40 na limfocitu B dovodi do aktivacije limfocita B, a citokini koje izlučuje aktivirani limfocit T (IL-4, IFN- γ i TGF- β) omogućuje prekapčanje imunoglobulinskog razreda u limfocitu B (IgM \rightarrow IgG/IgA/IgE). U osoba s manjkom ili nedostatnom funkcijom CD40-liganda (CD154) na limfocitima T izostaje stanična kooperacija i mogućnost prekapčanja imunoglobulinskog razreda "sindrom hiper IgM" (13). Danas je poznato da taj sindrom uključuje nekoliko inačica, ovisno o genskom oštećenju ne samo limfocita T, već i limfocita B (14). Stoga i ne čudi nalaz CD154 na aktiviranim limfocitima T u dijela bolesnika sa sindromom hiper-IgM.

Testovi citotoksičnosti

U citotoksične testove ubrajaju se test citotoksičnosti limfocita T i NK-aktivnost (1, 3, 7, 8). Oba testa rabe istu metodologiju, tj. oslobađanje radioaktivnog kroma (^{51}Cr) ili drugih pogodnih spojeva (npr. fluorescentne boje) iz prethodno obilježenih ciljnih stanica. Novije metode rabe protočnu citometriju s pomoću koje se može mjeriti udio lizirani (mrtvih) stanica ili pak sniženje udjela vitalno obilježenih (fluorescentnih) ciljnih stanica.

Testovi citotoksičnosti limfocita T obično se ne izvode u rutinskom dijagnostičkim laboratoriju (1, 3, 12). Najčešće se rabi test ubijanja alogeničnih (tuđih) stanica i test ubijanja vlastitih stanica zaraženih virusima (obično B-limfocita zaraženih virusom EBV). U oba slučaja ciljne stanice (alogenične stanice ili virusom zaražene vlastite stanice) najprije se obilježe pogodnim markerom, potom inkubiraju s efektorskim (ispitivanim) limfocitima T, a stupanj otpuštanja markera (radioaktivnog spoja ili boje) proporcionalan je stupnju citolize (1, 3).

NK-aktivnost mjeri spontanu citolitičku aktivnost prirodno ubilačkih ili NK-stanica (prema engl. *natural killer*). Za razliku od citotoksičnih limfocita T, kojima za razvoj u stanice-ubice treba i nekoliko dana, NK-stanice su djelotvorne već nakon par sati od inkubacije s ciljnim stanicama. Njihova se aktivnost klasično mjeri testom oslobađanja radioaktivnog kroma iz ciljnih stanica, slično testu citotoksičnosti limfocita T (1, 3, 8). Međutim, za razliku od citotoksičnih limfocita T, mjerenje citotoksične aktivnosti NK-stanica ne zahtijeva ciljne stanice podudarne u lokusu HLA. Ciljne stanice u testu NK-aktivnosti su stanice ljudskih tumorskih staničnih linija, od kojih je najpoznatija linija K562. Ciljne i izvršne stanice (limfociti periferne krvi) međusobno se pomiješaju u određenim omjerima i inkubiraju tijekom 4 sata, nakon čega se izmjeri radioaktivnost oslobođena iz ciljnih stanica. Umjesto radioaktivnog testa, danas se sve više rabi fluorescentna metoda s pomoću protočne citometrije.

Pretrage fagocita

Specijalni testovi fagocita (neutrofila i monocita/makrofaga) uključuju ispitivanje adhezijskih biljega i funkcijske testove fagocita (1, 8, 15).

Izražaj adhezijskih molekula fagocita

Imunodeficit zbog manjka adhezijskih molekula fagocita naziva se leukocitni adhezijski defekt tip 1 (LAD1) (1, 8, 15). Fagociti (posebice neutrofil) pokazuju oslabljenu kemotaksiju, adheziju i endocitozu, a klinički se poremećaj očituje povećanim brojem leukocita, infekcijama kože (bez granuloma), peridontitisom i intestinalnim fistulama. Uzrok poremećaja leži u nedostatku heterodimernih površinskih adhezijskih glikoproteina - leukocitnog funkcijskog antigena LFA-1/CD11a, receptora za komplement iC3b (CR2/CD11b) i receptora za komplement C3d (CR4/CD11c). Nedostatak tih molekula nastaje zbog abnormalne biosinteze β -lanca (CD18) koji je zajednički lanac svim navedenim adhezijskim receptorima.

Funkcijski testovi fagocita

Antimikrobna aktivnost fagocita može se podijeliti u četiri međusobno povezana mehanizma:

- migraciju stanica u smjeru kemijsko-biološkog podražaja (*kemotaksija*);
- adheziju;
- fagocitozu;
- unutarstaničnu razgradnju mikroorganizama (1, 8, 15).

Ispitivanje *kemotaksije* neutrofila *in vitro* može se sprovesti s pomoću specijalnih Boydenovih komorica (kemotaksija neutrofila kroz filter u smjeru podražaja) ili u mekom agaru koji omogućuje kretanje neutrofila u smjeru podražaja. *Fagocitoza* se ispituje na različite načine: jednostavnije metode rabe citomorfološku analizu obojenih neutrofila s ingestiranim kvasnicama, dok se suvremenije metode temelje na protočnometrijskoj analizi fluorescentnog signala neutrofila i monocita nakon fagocitoze obilježenih (fluorescentnih) bakterija. Sposobnost *oksidativnog metabolizma fagocita* (respiracijskog praska, engl. *respiratory burst*) može se, također, ispitati na nekoliko načina. Starija metoda, poznata pod nazivima redukcija boje NBT ili *formazanski test*, temelji se na pretvorbi tetrazolijske soli NBT (nitroblue tetrazolium) u netopive precipitate formazana u citoplazmi i na membrani neutrofila nakon podražaja odgovarajućim tvarima (npr. forbol-esterom). Danas, međutim, sve više prevladava protočnometrijska analiza koja se temelji na mjerenju fluorescencije stanica nakon konverzije nefluorescentnog u fluorescentni spoj unutar neutrofila nakon podražaja aktivatorima (npr. jonomicinom i forbol-esterom). Nesposobnost razvoja respiracijskog praska karakterističan je nalaz u bolesnika s kroničnom granulomatoznom bolesti. Intenzitet fluorescencije granulocita ne otkriva samo bolesnike (negativni nalaz), već i prenositelje ove X-vezane bolesti, kao i dvije inačice (genotipa) bolesti - X-vezanu i autosomno-recesivnu. *Mikrobidnu aktivnost*, tj. unutarstaničnu razgradnju mikroorganizama omogućuju produkti oksidativnog metabolizma (tzv. respiracijskog

praska) fagocita - H_2O_2 i reaktivni radikali ($OH\cdot$ i $O_2\cdot^-$), kao i mikrobicidne tvari - laktoferin, lizozim i defenzini. U tom se postupku granulociti inkubiraju s bakterijama i ljudskim serumom (izvorom komplementa i opsonina), nakon čega se u određenim vremenskim intervalima određuje broj živih bakterija u nadtalogu inkubacijske smjese. Metoda je prilično složena i nestandardizirana, pa se relativno rijetko izvodi (8).

Molekularno-biološke analize

Velik broj primarnih imunodeficijencija nastaje zbog oštećenja gena koji kodiraju molekule uključene u imunosti odgovor (1, 3, 6, 16). Stoga je za konačnu dijagnozu bolesti potrebno učiniti molekularnu analizu na razini gena i/ili biokemijsku analizu abnormalnih produkata (Tablica 2) (3, 16). Razvoj tehnologije sekvenciranja gena na temelju fluorescencije i kapilarne elektroforeze omogućuje još izravniju primjenu analize mutacija u velikom broju imunodeficijencija. Ta je činjenica važna i za genetsko savjetovanje temeljeno na prenatalnoj dijagnostici i otkrivanju nositelja mutacije. Važnost ove tehnologije pokazana je na sindromu hiper-IgM: dok je ranije smatran jedinstvenim poremećajem, analiza mutacija gena pokazala je da se radi o nekoliko tipova oštećenja gena koja zahvaćaju ne samo limfocite T, već i limfocite B (3, 14). U skladu s tim je i raznolika klinička prezentacija tog sindroma. Iz navedenoga proizlazi da napredak laboratorijske tehnologije omogućuje sve bolji uvid u razumijevanje imunopatogeneze specifičnih imunodeficijencija, a ta činjenica postavlja nove zahtjeve pred klinički laboratorij.

SEKUNDARNE IMUNODEFICIJENCIJE

Sekundarne imunodeficijencije daleko su češće od primarnih, a nastaju kao rezultat mnogobrojnih patoloških stanja (1, 4, 5). Najčešće uzroci stečene imunodeficijencije jesu pothranjenost, metaboličke bolesti (šećerna bolest, Cushingov sindrom), zarazne bolesti (AIDS, citomegalovirus), autoimune bolesti (npr. sistemski lupus eritematosus), opsežne povrede (posebice termičke), primje-

na imunosupresijskih lijekova i zračenja, kao i transplantacija tkiva i organa. Oštećenje može zahvatiti nespecifičnu (npr. kožu, sluznice i njihove izlučevine, normalnu mikrobnu floru, granulocite i fagocitozu, NK-stanice i komplement) i specifičnu imunost (limfocite T i B, odnosno protutijela). Međutim, u većine imunokompromitiranih bolesnika postoji združen poremećaj obrane, kao što je npr. oštećenje sluznice zračenjem i citostaticima i snižen broj leukocita u krvi.

Dijagnostika sekundarnih imunodeficijenција

U načelu, laboratorijska dijagnostika sekundarnih imunodeficijenција ne razlikuje se od dijagnostike primarnih imunodeficijenција. U oba slučaja laboratorijska dijagnostika ima za cilj i predviđanje vrste potencijalne zaraze, budući da zaraze u tih bolesnika često imaju atipični oblik i više uzročnika (npr. pneumonija uzrokovana citomegalovirusom i *Pneumocystis sp.* u bolesnika s transplantiranom koštanom srži) (Tablica 6) (1, 8, 17).

NOVIJE SPECIJALNE PRETRAGE LIMFOCITA

Radi se o testovima koji još uvijek nisu dio rutinske imunodijagnostike, već najčešće služe u znanstvenoistraživačke

svrhe. Među njima su posebno izdvajaju T-stanična spektratipizacija (engl. *T-cell spectratyping*), analiza TREC⁺ limfocita i tehnologija MHC/HLA-tetramera (3, 8).

T-stanična spektratipizacija označava analizu varijabilnih regija β-lanaca (Vβ) receptora limfocita T s pomoću metode PCR. U normalnim su prilikama sve obitelji Vβ-lanaca (n=24) podjednako zastupljene u receptorima limfocita T, što govori za poliklonsku narav limfocita T u periferiji. U nekim imunodeficijenциjama (npr. u Omenovom sindromu) i nakon transplantacije krvotvornih stanica, nalazi se ograničen broj obitelji Vβ-lanaca receptora limfocita T u krvi i tkivima. Taj nalaz govori u prilog oligoklonskog razvoja limfocita T (18).

Analiza TREC⁺ stanica. Pojednostavljeno, tijekom razvoja limfocita T, suvišak genskog materijala koji je odgovoran za receptor limfocita T biva izrezan iz DNA i tvori kružne strukture unutar stanice (engl. *T-cell receptor excision circles, TRECs*). Novonastali (naivni) limfociti T su TREC⁺ stanice, dok limfociti T nakon podražaja i dioba gube TREC, pa se smanjuje i ukupni udio TREC⁺ stanica u periferiji. Metoda se najčešće rabi u istraživanju T-staničnih imunodeficijenција (npr. DiGeorgeovog sindroma) i oporavka limfocita T nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica (19).

Tehnologija HLA/MHC-tetramera važna je za određivanje broja antigen-specifičnih limfocita T, posebice u istraživanjima virusnih zaraza, cijepljenja i autoimunosti, pa je za sada ograničena na specijalizirane istraživačke centre (3, 20).

UMJESTO ZAKLJUČKA

Mogućnosti ispitivanja imunološkog sustava sve su veće, posebice kada se to pitanje razmatra u sklopu suvremenih laboratorijskih tehnika. Međutim, pravi izazov za laboratorij predstavlja prijenos sve složenijih laboratorijskih tehnika u klinike i kliničke laboratorije. Bez uvođenja suvremenih tehnologija i metoda u rutinski laboratorij neće biti moguće odgovoriti na sve veće zahtjeve za brzim i pouzdanom dijagnostikom, a time i odgovarajućim liječenjem bolesnika s imunodeficijenциjom.

LITERATURA

1. Conley ME, Stiehm ER. Immunodeficiency disorders: General considerations. U: Stiehm ER (ur). Immunologic Disorders in Infants and Children, 4th edition. Philadelphia: WB Saunders, 1996; 201.
2. Bonilla FA, Rosen FS, Geha RS. Primary Immunodeficiency Diseases. U: Nathan DG, Orkin SH (ur.). Hematology of Infancy and Childhood. 5th Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998.

Tablica 6.

Povezanost između specifičnog imunodeficitu i predispozicije za zarazu specifičnim uzročnikom(1, 2, 17)

Table 6

Association of specific immunodeficiency and predisposition for infection with specific agent (1, 2, 17)

Oštećenje	Uzrok (bolest ili jatrogeni učinak)	Najčešći uzročnici zaraze
Neutropenija	hemoblastoze, citostatici, aplastična anemija	Gram-negativne bakterije, Staphylococcus aureus, Candida sp., Aspergillus sp.
Kemotaksije granulocita	Chediak-Higashijev sindrom	Streptococcus pneumonia, Haemophilus influenzae
Splenektomija	trauma, liječenje trombocitopenije	H. influenzae, S. Pneumoniae, streptokoki
Manjak C3-komplementa	urođeni manjak, sistemski lupus eritematodes, bolesti jetre	S. pneumoniae, S. Pneumoniae, Pseudomonas sp., Proteus sp.
Manjak ili oštećenje funkcije limfocita T	aplazija timusa, Hodgkinova bolest, sarkoidoza, lepra	Listeria monocytogenes, Mycobacterium sp., Candida sp., Aspergillus sp., Cryptococcus, Herpes simplex, Herpes zoster
Manjak ili oštećenje funkcije limfocita T	sindrom stečene imunodeficijenције (AIDS)	Pneumocystis carinii, Cytomegalovirus, Herpes simplex virus, Candida sp., Mycobacterium avium
Manjak limfocita B ili protutijela	agamaglobulinemija, kronična limfocitna, leukemija, multipli mijelom	Staphylococcus aureus, S. pneumoniae, N. meningitidis, H. influenzae, Klebsiella pneumonia, E. Coli, Giardia lamblia

3. Fleisher TA, Oliveira JB. Functional and molecular evaluation of lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 227-34.
4. Cooper MD, Lanier LL, Conley ME, Puck JM. Immunodeficiency disorders. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003; 314-30.
5. Chinen J, Shearer WT. Advances in asthma, allergy and immunology series 2004: basic and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 398-405.
6. Fischer A. Human primary immunodeficiency diseases: a perspective. *Nat Immunol* 2004; 5 (1): 23-30.
7. Folds JD, Schmitz JL. Clinical and laboratory assessment of immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111 (Supl 2): 702-11.
8. Rose NR, Hamilton RG, Detrick B. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington (DC): American Society for Microbiology, 2002.
9. Katalog laboratorijskih pretraga. Priručnik za korisnike laboratorijskih usluga. 2. izdanje. Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta u Zagrebu i KBC Zagreb, Zagreb, 2002.
10. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, Oyomopito R, Plaeger S, Stiehm ER, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 973-80.
11. Chinen J, Rosenblatt HM, Smith EO, Shearer WT, Noroski LM. Long-term assessment of T-cell populations in DiGeorge syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 573-9.
12. Batinić D, Marušić M. *Imunologija*. U: Vrhovac B & suradnici. *Interna medicina*. Zagreb: Naklada Ljevak, Zagreb, 2003; 202-9.
13. Winkelstein JA, Marino MC, Ochs H, Fuleihan R, Scholl PR, Geha R et al. The X-linked hyper-IgM syndrome: clinical and immunologic features of 79 patients. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82: 373-84.
14. Durandy A, Revy P, Fischer A. Human models of inherited immunoglobulin class switch recombination and somatic hypermutation defects (hyper-IgM syndromes). *Adv Immunol* 2004; 82: 295-330.
15. Rosenzweig SD, Holland SM. Phagocyte immunodeficiencies and their infections. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113 (4): 620-6.
16. Lim MS, Elenitoba-Johnson KS. The molecular pathology of primary immunodeficiencies. *J Mol Diagn* 2004; 6 (2): 59-83.
17. Somech R, Amariglio N, Spierer Z, Rechavi G. Genetic predisposition to infectious pathogens: a review of less familiar variants. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22 (5): 457-61.
18. Villa A, Santagata S, Bozzi F, Imberti L, Notarangelo LD. Ommen syndrome: a disorder of RAG1 and RAG2 genes. *Clin Immunol* 1999; 19: 87-97.
19. Markert ML, Boeck A, Hale LP, Kloster AL, McLaughlin TM, Batchvarova MN et al. Transplantation of thymus tissue in complete DiGeorge syndrome. *N Engl J Med* 1999; 341: 1180-9.
20. Kita H, He XS, Gershwin ME. Application of tetramer technology in studies on autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 43-9.

Summary

LABORATORY DIAGNOSTICS OF IMMUNODEFICIENCY SYNDROMES

D. Batinić

The laboratory tests are essential in the evaluation of immune status and play a major role in the diagnosis, treatment and follow-up of patients with immune deficiencies. The capacity to evaluate immune system has progressed along with the advances in understanding the details of normal immunological response and in parallel with the development in modern laboratory tools. However, the increased number of laboratory tests should warn clinicians and laboratory immunologists to choose the most appropriate testing in individuals with suspected specific immunodeficiency. Therefore, the immune function evaluation should start with screening tests and, on the basis of the primary results, should extend to more sophisticated and more expensive tests. Finally, the progress in laboratory technologies is likely to provide more insight into immunopathogenesis of specific immunodeficiencies, a fact that will set new standards and requirements for routine clinical laboratory.

Descriptors: IMMUNE DEFICIENCY, LYMPHOCYTES, LABORATORY IMMUNOLOGY, DIAGNOSTIC IMMUNOLOGY