

## RACIONALNI PRISTUP LABORATORIJSKOJ DIJAGNOSTICI IMUNOLOŠKIH POREMEĆAJA

DRAGO BATINIĆ<sup>1</sup>, BRANKO MALENICA<sup>2</sup>

*Laboratorijske pretrage su ključne za procjenu imunosnog statusa i imaju glavnu ulogu u dijagnostici, liječenju i praćenju bolesnika s različitim oblicima imunoloških poremećaja, uključujući imunodeficiencije, autoimunosne bolesti i reakcije preosjetljivosti. Mogućnost ocjene imunosnog sustava napredovao je zajedno s napretkom u razumijevanju funkcioniranja imunosnog sustava i razvojem modernih tehnologija. Međutim, zadnjih se godina broj zahtjeva za imunološkim pretragama značajno povećao ponajviše zbog slabog poznavanja analitičkih vrijednosti pojedinih imunoloških testova kao i zbog nepoštivanja općih dijagnostičkih smjernica. Ovakvo stanje upozorava kliničare i laboratorijske imunologe da slijede laboratorijske dijagnostičke smjernice predložene od strane međunarodnih ekspertnih timova i da započnu usko surađivati u cilju rješavanja svakodnevne rutine.*

Deskriptori: IMUNOLOŠKI POREMEĆAJI, LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA, PROTOKOLI

### UVOD

Laboratorijske imunološke pretrage ključne su za analizu imunosnog statusa, a time i za dijagnostiku, liječenje i praćenje bolesnika s različitim poremećajima imunosnog sustava (1). Mogućnost laboratorijske imunodijagnostike napredovala je zajedno sa sve boljim razumijevanjem biologije i fiziologije imunosnog sustava, kao i razvojem suvremenih laboratorijskih metoda. Međutim, zadnjih se godina broj zahtjeva za imunološkim pretragama značajno povećao ponajviše zbog slabog poznavanja analitičkih vrijednosti pojedinih imunoloških testova kao i zbog nepoštivanja općih dijagnostičkih smjernica. Ovakvo stanje upozorava kliničare i laboratorijske imunologe

da slijede laboratorijske dijagnostičke smjernice predložene od strane međunarodnih ekspertnih timova i da započnu usko surađivati u cilju rješavanja svakodnevne rutine.

U struci se sve više govori o smjernicama i preporukama za laboratorijsku dijagnostiku određenog kliničkog pitanja imajući pritom na umu njihovu dijagnostičku vrijednost "performance". To je posebno naglašeno zadnjih godina u sklopu koncepta "medicine temeljene na činjenicama" što je dodatno potaknulo zanimanje za razvoj laboratorijskih dijagnostičkih smjernica (2). Osim boljeg poznavanja dometa i dijagnostičke vrijednosti pojedinih imunoloških pretraga, ne smiju se zanemariti ekonomski aspekti imunološkog testiranja (koje je obično vrlo skupo!), odnosno stalno isticati nužnost što bolje komunikacije između liječnika kliničara i laboratorijskog imunologa.

U pravilu, laboratorijsko ispitivanje građe i funkcije imunosnog sustava treba se odvijati prema dogovorenim dijagnostičkim algoritmima poštujući stručne i ekonomske kriterije (3-5). To jednostavno znači da svako ispitivanje imunosnog sustava treba započeti manje složenim

testovima probira za određeno indikacijsko područje kojima se mogu otkriti oštećenja funkcije imunosnog sustava. Daljnji tijek pretraga određen je rezultatima probira koji usmjeravaju daljnji odabir vrste i opsega pretraga. Poznavanje načela dijagnostičkih algoritama, a posebice testova probira važno je kako bi liječnici različitih profila (opći pedijatri, internisti, specijalisti imunolozi, obiteljski liječnici) mogli na vrijeme ukazati na određeni poremećaj imunosnog sustava, a koji mogu imati fatalan ishod ili rezultirati trajnim invaliditetom.

U ovom će se pregledu primarno obraditi laboratorijska dijagnostika imunodeficiencija i autoimunosnih bolesti, dok se problematika alergije, odnosno reakcija preosjetljivosti obrađuje u drugim člancima ovog suplementa. Limfoproliferativne bolesti pripadaju u hematološko-onkologiju i nisu predmetom ove rasprave.

### PRIMARNE IMUNODEFICIENCIJE

Primarne imunodeficiencije (PID) su poremećaji razvoja i funkcije imunosnog sustava (6-8). Glavna odlika PID-a jest povećana prijemčivost za infekciju, dok se neki oblici imunodeficitu prezen-

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku  
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
Klinički bolnički centar Zagreb

<sup>1</sup>Klinička jedinica za staničnu imunodijagnostiku

<sup>2</sup>Klinička jedinica za humoralnu imunodijagnostiku

Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. Drago Batinić

Klinička jedinica za staničnu imunodijagnostiku

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku

Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Klinički bolnički centar Zagreb

10000 Zagreb, Kišpatićeva 12

E-mail: dbatin@mef.hr

Tablica 1.  
Dijagnostički protokoli za primarne imunodeficiencije (PID) prema ESID-u (4-5)

Table 1  
Diagnostic protocols for primary immunodeficiencies (PID) according to ESID (4-5)

	Protokol 1 Protocol 1	Protokol 2 Protocol 2	Protokol 3 Protocol 3
	Humoralne imunodeficiencije Humoral immunodeficiencies	Združene T i B-imunodeficiencije, AIDS Combined T- and B-immunodeficiencies, AIDS	Neutropenija Neutropenia
Korak #1 (probir) Step #1 (screening)	Kompletna krvna slika (volumen trombocita, apsolutni broj limfocita, neutrofila i eozinofila) Serumski IgG, IgA, IgM i IgE Blood count and differential (platelet volume, absolute lymphocyte, neutrophil and eosinophil counts), Serum IgG, IgA, IgM and IgE	Kompletna krvna slika (volumen trombocita, apsolutni broj limfocita, neutrofila i eozinofila) Serumski IgG, IgA, IgM i IgE, Test na HIV-1 Blood count and differential (platelet volume, absolute lymphocyte, neutrophil and eosinophil counts), Serum IgG, IgA, IgM and IgE, HIV-1 testing	Kompletna krvna slika (apsolutni broj neutrofila, citološka analiza); ponavljati u slučaju cikličke pojave vrućice i infekcije; 3×tjedno tijekom 3-6 tjedana Blood count and differential (absolute neutrophil count, cytologic evaluation; perform repeatedly in case of cyclic pattern of fever and infections; 3×week for 3-6 weeks)
Prema nalazu probira učiniti sljedeće korake: According to screening perform next steps:			
Korak #2 Step #2	Pretrage za hipogamaglobulinemiju i komplement Tests for hypogammaglobulinaemia and complement	Pretrage za dokaz združene T- i B-imunodeficiencije Test for combined T- and B-immunodeficiencies	Pretrage za nalaženje uzroka neutropenije Tests for identifying the cause of neutropenia
Korak #3 Step #3	Pretrage na druge uzroke PID-a Tests for other causes of PID	Pretrage na druge uzroke PID-a Tests for other causes of PID	Pretrage fagocitne funkcije Test for phagocyte function
Korak #4 Step #4	Konačna dijagnoza, uključujući genetski defekt Final diagnosis, including genetic defect	Konačna dijagnoza, uključujući genetski defekt Final diagnosis, including genetic defect	Utvrđiti genetički defekt Identify genetic defect

tiraju kliničkom slikom autoimunosti ili limfoproliferacijom. Premda je do danas opisano više od 150 entiteta PID-a, većina registriranih PID-a u Europi otpada na humoralne imunodeficiencije, nakon čega slijede imunodeficit limfocita T, granulocita te potom drugi sindromi (6-8). Najčešći oblik imunodeficiencije jest manjak IgA (1:500), dok su združena imunodeficiencija (SCID) i manjak komplementa jedni od najrjeđih oblika PID-a (>1:100.000).

Ovdje treba posebno istaknuti imunodeficiencije koje karakterizira i poremećaj imunosne regulacije. To su prije svega hemofagocitna limfocitocitoza (HLH) i imunodeficiencije koje se prezentiraju atipičnom slikom autoimunosti, primjerice autoimuni limfoproliferativni sindrom (ALPS) (6). HLH se prezentira slikom sepse, odnosno teške upalne reakcije koja ne reagira na antibiotike i s negativnim hemokulturama. Za dijagnostiku HLH potrebno je dokazati 5 od 8 dijagnostičkih kriterija, među kojima su hepatosplenomegalija, bicitopenija,

povišeni serumski feritin i trigliceridi, snižen fibrinogen i snižena NK-aktivnost periferne krvi. Za dokaz ALPS-a ključno je dokazati povećani udio dvostruko-negativnih (CD4-CD8-) limfocita T koji izražavaju receptor TCRαβ, kao i pokazati smanjeno odumiranje limfocita nakon aktivacije i izlaganju protutijelu anti-Fas/CD95 (6).

#### Algoritam laboratorijske dijagnostike primarnih imunodeficiencija

Dijagnoza primarne imunodeficiencije (PID) nije laka, a vjerojatno se nerijetko i propušta. Naime, PID se često predstavljaju običnim, nespecifičnim simptomima pa se i dijagnoza obično kasno postavlja. Rana dijagnoza je važna jer se mogu spriječiti fatalne komplikacije u teških imunodeficiencija (npr. u SCID-u), odnosno spriječiti oštećenje organa u onih imunodeficiencija koje maju protrahirani tijekom, primjerice u običnoj varijabilnoj imunodeficienciji. S obzirom na složenost i skupoću imunoloških pretraga, racionalni pristup dijagnostici

imunodeficiencija u okviru dijagnostičkih algoritama od posebnog je značaja (9). U tom kontekstu posebno treba istaknuti inicijativu Europskog udruženja za imunodeficiencije (European Society for Immunodeficiencies, ESID) koja, osim razvoja dijagnostičkog algoritma za cilj ima i podizanje svijesti o važnosti ranog otkrivanja PID-a (3-5). Taj se koncept temelji na sljedećim premisama: 1. nužnosti ranog probira koji je usmjeren na kliničku sliku bolesnika; 2. primjeni dijagnostičkih protokola u nekoliko koraka; i 3. mogućnost primjene protokola od strane liječnika raznih specijalnosti, a ne samo imunologa. Naime, PID se mogu pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi kada se moraju dodatno diferencirati od sekundarnih imunodeficiencija i stanja sa sličnom kliničkom slikom.

Prema konceptu ESID-a, tri su temeljna dijagnostička protokola koji, de facto, ispituju tri klasična kraka imunosnog sustava - fagocite (urođenu imunosnost), humoralne efektore (protutijela i komplement) i stanične efektore (lim-

Tablica 2.  
Protočnometrijska analiza limfocitnih subpopulacija periferne krvi (A) i test proliferacije limfocita in vitro (B) (3-5)

Table 2  
Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocyte subpopulation (A) and lymphoproliferative assays in vitro (B) (3-5)

A. Subpopulacija* Subpopulation*	Biljezi Markers
Osnovni panel Basic panel	
Limfociti T T-lymphocytes	CD3+
Pomagački limfociti T Helper T-lymphocytes	CD3+CD4+
Citotoksični limfociti T Cytotoxic T-lymphocytes	CD3+CD8+
Omjer CD4/CD8 CD4/CD8 ratio	
Limfociti B B-lymphocytes	CD19+ i/ili CD20+
NK-stanice NK-cells	CD3-/CD16+ i/ili CD56+
Prošireni panel Extended panel	
Aktivirani limfociti T Activated T-lymphocytes	CD3+HLADR+
Limfociti Tγδ+ γδ+ T-lymphocytes	CD3+/TCRγδ+
Dvostruko negativni limfociti Tαβ+ Double-negative αβ+ T-lymphocytes	CD3+/TSRαβ+/CD4-/CD8-
Naivni pomagački limfociti T Naive helper T-lymphocytes	CD3+/CD4+/CD27+/CD45RA+
Memorijski prekopčani limfociti B Switched memory-B lymphocytes	CD19+/CD27+/IgM-/IgD-
B. Podražaj Stimulus	Metode Methods
Mitogeni /mitogens: phytohemaglutinin (PHA), concavalin A (Con A), pokeweed mitogen (PWM)	
Antigeni/antigens: PPD, tetanusni toksoid/tetanus toksoid, kandidin/candidin	- ugradnja [3H]-timidina/uptake of [3H]-thymidine
Aktivatori signalnih puteva/signaling pathways activators forbol-ester/phorbol-ester (PMA) jonomicin/ionomycin	- protočna citometrija/flow cytometry:

fociti T i NK-stanice) (Tablica 1) (3-5). Liječnik na temelju anamneze, kliničke slike i drugih nalaza usmjerava i odabire najinformativniji laboratorijski dijagnostički protokol za određenu skupinu PID-a. Svaki se laboratorijski protokol sastoji od nekoliko koraka, pri čemu prvi korak sadržava jednostavne laborato-

rijske pretrage dostupne većini bolnica, dok naredni koraci sadržavaju sve složenije pretrage i metodologije.

Prvi korak služi za probir "screening" specifičnih imunosnih poremećaja, posebice onih teških, dok se lakši poremećaji obično otkrivaju u narednim koracima nakon isključenja različitih

neimunskih poremećaja. Drugim riječima, pozitivan nalaz na probiru, kao i perzistencija simptoma PID-a unatoč negativnom nalazu probira nalažu izvođenje složenijih laboratorijskih pretraga (Tablica 2 i 3). U skladu s time, konačna dijagnoza i klasifikacija poremećaja donosi se na temelju specijaliziranih imunoloških i molekularnih dijagnostičkih pretraga. Logično je da se prvi koraci unutar dijagnostičkih protokola - diferencijalna krvna slika i razina serumskih imunoglobulina - mogu obaviti i u nespecijaliziranim ustanovama, dok se svi naredni koraci izvode u specijaliziranim ustanovama i laboratorijima. Pri tome je važno imati na umu nekoliko činjenica: 1. rezultate laboratorijskih pretraga uvijek sagledavati u odnosu na referentne intervale odgovarajućih dobnih skupina, posebice za dojenačku i predškolsku dob; 2. za pretrage bez "zlatnog standarda" usporedno treba analizirati uzorak podrijetlom od "zdrave" kontrole; i 3. uvijek raditi u timu i koristiti usluge laboratorijskog imunologa (3-6).

Sekundarne imunodeficiencije se prezentiraju slično kao i primarne, pa ih se nikako ne smije zanemariti. Pažnju treba obratiti na zarazu virusom HIV-1, kao i na lijekove i bolesti (posebice maligne) koje uzrokuju gubitak proteina i smanjen broj leukocita.

#### AUTOUPALNE I AUTOIMUNOSNE BOLESTI

Bitno svojstvo imunosnog sustava jest da razlikuje vlastito od tuđeg. Sukladno tome, zreli imunokompetentni limfociti prepoznaju i reagiraju na strane antigene (viruse, bakterije, tumore), dok u normalnim okolnostima ne prepoznaju niti reagiraju na vlastite antigene. Važno je napomenuti da tu paradigmu sve ustrajnije potiskuje ona koja umjesto razlikovanja "vlastitog od tuđeg" uvodi prepoznavanje i imunoreakciju protiv "pogibeljnog" (engl. *dangerous*) (10-11).

#### Autoupalne bolesti

Prvi kontakt s tuđim ostvaruju stanice urođene imunosne - makrofagi i dendritične stanice - koje imaju i funkciju predočavanja antigena zrelim limfocitima T. Te stanice izražavaju membranske

Tablica 3.  
Funkcijske pretrage granulocita (4-5)

Table 3  
Granulocyte functional assays (4-5)

Pretraga Test	Metodologija Methodology
Imunofenotipizacija (CD11b/CD18) Immunophenotyping (CD11b/CD18)	protočna citometrija flow cytometry
Sadržaj granula Granule contents	elektronska mikroskopija/electron microscopy imunohistokemija/immunohistochemistry
Kemotaksija Chemotaxis	migracija na kemoatraktant migration to a chemoattractant
Fagocitoza Phagocytosis	E. coli konjugirane s fluoresceinom (protočna citometrija) fluorescein-conjugated E. coli (flow cytometry)
Respiracijski prasak Respiratory burst	nitro-blue tetrazolijski test/nitroblue tetrazolium test (NBT) protočna citometrija s fluorescentnim probama/flow cytometry using fluorescent probes
Baktericidno djelovanje Bacterial killing	mikrobiološko testiranje s <i>Staphylococcus aureus</i> microbial testing using <i>Staphylococcus aureus</i>

i citoplazmatske receptore PRR (prema engl. *pattern recognition receptors*) koji prepoznaju opće strukture patogena, a koje su zajedničke velikom broju istovrsnih mikroorganizama. Stoga se one

još nazivaju i molekularnim obrascima udruženim s patogenima (PAMP, prema engl. *pathogen-associated molecular patterns*). Ako je, međutim, riječ o vlastitim strukturama nastalim propa-

danjem vlastitih stanica zbog ozljede ili traume, tada se nazivaju "pogibeljnim" molekularnim obrascima (DAMP, prema engl. *dangerous-associated molecular patterns*). Vežanjem za odgovarajuće membranske i/ili citoplazmatske receptore, PAMP i DAMP potiču produkciju proupalnih citokina, kemokina i drugih biološki aktivnih medijatora koji u konačnici uzrokuju upalu s ciljem uklanjanja antigena/patogena (12-13). Međutim, trajna aktivacija tih receptora uzrokuje upalno oštećenje tkiva pa govorimo o autoupalnim sindromima. Klinički, autoupalne sindrome možemo definirati kao stanja koja karakteriziraju rekurentni napadaji sistemske upale u odsutnosti patogena ili autoantigena (odnosno autoantitijela ili autoreaktivnih limfocita T), pri čemu jednu od najvažnijih uloga ima produkcija interleukina 1 (IL-1) (13-14). Oni su rjeđe posljedicom mutacije pojedinog gena (kao npr. u familijarnoj mediteranskoj groznici), dok se češće radi o poligenomskom poremećaju (npr. morbus Behcet).

#### Autoimunosne bolesti

Autoimune bolesti nastaju kao posljedica pretjerane reakcije adaptivnog imunostanica na sastavnice vlastitog organizama. Izvršni mehanizmi autoimunoreakcije su humoralni (imunološka preosjetljivost tipa II i III) i stanični (imunološka preosjetljivost tipa IV) (15-16). U autoimunosnoj reakciji preosjetljivosti tipa II protutijela se vežu za odgovarajuće antigen(e) na stanicama i tkivima nakon čega mogu dovesti do razaranja stanica (npr. u hemolitičkoj anemiji), sprječavanja normalne funkcije stanica (npr. blokade acetil-kolinjskih receptora u mijasteniji gravis) ili pak pretjerane stimulacije stanica (npr. tireocita u hipertireozu). U bolestima imunokompleksa (imunološka preosjetljivost tip III) nastali kompleksi antigena i autoantitijela se talože u tkiva, posebice u kožu, bubrege, zglobove i pluća, a daljnjim aktiviranjem komplementa i fagocitnih stanica uzrokuju tkivna oštećenja. Za razliku humoralnog, stanična autoimunoreakcija uzrokuje tkivna oštećenja izravno citokinima koje luče limfociti T<sub>H</sub>1 ili aktiviranjem makrofaga i upalne reakcije u ciljnom tkivu (klasična preosjetljivost

Tablica 5.  
Specifična laboratorijska imunodijagnostika autoimunskih bolesti

Table 5  
Specific laboratory parameters in immunodiagnosis of autoimmune diseases

Imunoglobulini/Immunoglobulins
Kvantitativno/quantitative
Parametri humoralne autoimunoreakcije/Parameters of humoral autoimmune reaction
određivanje autoantitijela/detection of autoantibodies
određivanje ciljnih autoantigena/detection of target autoantigens
određivanje cirkulirajućih imunokompleksa/determination of circulating immunocomplexes
Parametri celularne autoimunoreakcije*/Parameters of cellular autoimmune reaction*
određivanje citokina/detection of cytokines
određivanje pomagačkih i citotoksičnih limfocita T/detection of helper and cytotoxic T-lymphocytes
Komplement/Complement
funkcijski aktivacijski test (CH50, AH50)/functional activation assay (CH50, AH50)
mjerjenje C3, C4 i C1-inhibitora/C3, C4 and C1-inhibitor measurement
HLA-tipizacija/HLA typing
serološka tipizacija/serologic typing
DNA-tipizacija/DNA typing

\*rijetko u rutinskim dijagnostičkim laboratorijima (v. tekst)

\*rarely in routine clinical diagnostic laboratory (see text)

tipa IV) ili izravnim citotoksičnim djelovanjem limfocita T (CTL) protiv stanica koje nose ciljni autoantigen.

Interakcija izvršnih mehanizama autoimunoreakcije s ciljnim antigenima uzrokuje bolest. Kliničku sliku bolesti određuje tkivo i organ u kojemu se nalazi napadnuti autoantigen. Shodno tome, autoimunosne bolesti se dijele na organospecifične i organonespecifične (sistemske) bolesti (15).

#### Laboratorijska dijagnostika autoimunskih i autoupalnih bolesti

S obzirom na raznovrsne etiopatogenetske čimbenike i mehanizme oštećenja tkiva, u laboratorijskoj dijagnostici autoimunskih i autoupalnih bolesti rabimo metode opće laboratorijske dijagnostike (Tablica 4) i specifične imunodijagnostičke metode (Tablica 5).

#### Opći parametri upale

Parametri upale služe za diferencijalnu dijagnostiku i razlikovanje upalnih od neupalnih, odnosno autoimunskih od degenerativnih i parareumatskih bolesti (17-18). Pored dijagnostičkog doprinosa, ti parametri služe i za kliničko

#### Određivanje efektor autoimunosti

Specifična laboratorijska imunodijagnostika autoimunskih bolesti temelji se na detekciji specifičnih serumskih autoantitijela (serološka imunodijagnostika), imunih limfocita, odnosno citokina (celularna imunodijagnostika), sustava komplementa te određivanja haplotipa HLA (Tablica 5).

Unatoč navedenim mogućnostima, rutinska se laboratorijska imunodijagnostika u pravilu svodi na određivanje serumskih autoantitijela i dokazivanju njihovih ciljnih autoantigena (18-21). Nalaz stanovitog autoantitijela može biti povezan s kliničkom ekspresijom bolesti. Razina (titar, količina) stanovitog autoantitijela može biti povezana s aktivnošću i raširenošću bolesti te pridonijeti procjeni uspješnosti primijenjenog liječenja. Detekcija cirkulirajućih imunokompleksa (CIC) nema dijagnostičku pouzdanost kakvu imaju specifična autoantitijela jer metode njihove detekcije ne određuju njihovu antigensku specifičnost pa tako ni njihovu specifičnost za dotičnu autoimunosnu bolest. Određivanje izvršnih molekula stanične autoimunoreakcije (citokina i limfocita T) je tehnološki zahtjevnija, skuplja i manje specifična pa se rabi vrlo selektivno, odnosno rijetko rabi u rutinskoj laboratorijskoj imunodijagnostici autoimunskih bolesti (16, 18, 19). Unatoč tome, ti parametri doprinose razumijevanju imunopatogeneze i odabiru ciljane biološke terapije u liječenju stanovitih autoimunosnih bolesti.

Mjerenje titra specifičnih antitijela protiv specifičnih antimikrobnih antigena rabi se u laboratorijskoj dijagnostici prirodnih imunodeficijenција i dijagnostici autoimunskih bolestima. Nalaz specifičnih serumskih antitijela dokaz je da je imunostanica sustav bolesnika prepoznao stanoviti mikroorganizam. Može se posegnuti i za izravnim dokazivanjem uzročnika.

#### Metode za određivanje specifičnih autoantitijela

Dokazivanje serumskih autoantitijela i njihovih ciljnih autoantigena najpouzdanija je sastavnica u rutinskoj

Tablica 6.

Preporučeni laboratorijski postupci za određivanje specifičnih autoantitijela i njihovih ciljnih autoantigena u dijagnostici autoimunskih bolesti

Table 6

Recommended laboratory testing for detection of specific autoantibodies and their target autoantigens in laboratory diagnosis of autoimmune diseases

Bolest Disease	Probirni test Screening test	Potvrđni test (autoantigeni) Confirmatory test (autoantigens)	Dodatno testiranje Additional testing
SLE	IIF	ds-DNA, Sm, U1-RNP, SS-A, SS-B, rib P, cardiolipin (Cl)	β2-GPI, RF
SjS	IIF	SS-A, SS-B	ds-DNA, Sm, U1-RNP, RF, cardiolipin (aCl)
SSc	IIF	DNA topo I, (SCI-70), U1-RNP	cardiolipin (aCl)
PM/DM	IIF	U1-RNP, Jo-1	cardiolipin (aCl)
RP	IIF	U1-RNP, CENP, DNA-topo I, cardiolipin (Cl), β2-GPI	
RA	IIF, RF	CCP	
APS	IIF, cardiolipin (aCl), β2-GPI	ds-DNA, Sm	

IIF, indirektna imunofluorescencija/indirect immunofluorescence; SLE, sistemski eritematozni lupus/systemic lupus erythematosus; SjS, Sjogrenov sindrom/ Sjogren's syndrome; SSc, sistemska skleroza; systemic sclerosis; PM/DM, poliomiozitis i dermatozitis/ polymyositis and dermatomyositis; RP, Raynaudov fenomen/ Raynaud's phenomenon; RA, reumatoidni artritis/rheumatoid arthritis; APS, antifosfolipidni sindrom/ antiphospholipid syndrome

laboratorijskoj imunodijagnostici autoimunskih bolesti (18-23). U tu svrhu rabe se brojne imunološke metode koje obično svrstavamo u dvije skupine: 1) metode pretraživanja (probira) kojima se otkrivaju autoantitijela u serumu; i 2) potvrdne (konfirmacijske) metode kojima se utvrđuje specifičnost autoantitijela, odnosno dokazuje ciljni autoantigen (Tablica 6).

Metode pretraživanja služe za pouzdanu detekciju određenog autoantitijela pa je svrsishodno da su osjetljive, specifične, reproducibilne, jednostavne za izvođenje, brze i po mogućnosti jeftine. Metodu indirektnu imunofluorescencije (IIF) krasi većina navedenih obilježja i u pravilu se rabi kao metoda pretraživanja na za to prikladnim kriostatnim preparatima tkiva (miš, štakor, majmun, čovjek) ili stanica (granulociti, HEp-2 stanična linija humanog karcinoma). Izbor tkiva ovisi o tome koje antitijelo ili više njih želimo otkriti. Primjerice, za detekciju antinuklearnih antitijela (ANA) možemo upotrijebiti tkivne preparate mišje, štakorske i majmunske jetre te HEp-2 stanice. HEp-2 stanice imaju izrazitu prednost u detekciji ANA pred tkivnim preparatima jetre zbog veće osjetljivosti i mogućnosti detekcije autoantitijela protiv ekstraktibilnih nuklearnih antigena (ENA, prema engl. extractable nuclear

antigens). Obrazac imunofluorescencije na tkivnim ili staničnim preparatima uglavnom je karakterističan za pojedino ili više srodnih autoantitijela što omogućuje odabir potvrdne metode za dokazivanje ciljnih autoantigena (Tablica 6). Kao osjetljive i pouzdane metode pretraživanja može se upotrijebiti enzimoimunotest (ELISA), dakako, samo za pročišćene i rekombinantne autoantigene. Protustrujna imunoelektroforeza (CIE-counter immunoelectrophoresis) kao metoda pretraživanja može se rabiti u detekciji brojnih ENA- antigena (U1-RNP, Sm, SS-A, SS-B, DNA topo I i Jo-1). U zadnje se vrijeme u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici kao metode pretraživanja rabi imunotest s mikrokuglicama obilježenim fluorescentnim bojama (Luminex) i linijski imunoblot (LIA, prema engl. line-immunoblot assay), poglavito za detekciju ANA (24-25).

Kao standardne potvrdne metode rabe se specifične ELISA za određeni autoantigen, imunoblot (IB) i sve češće imunotest s mikrokuglicama koji omogućuju istodobnu detekciju svih dijagnostički važnih autoantigena za pojedinu ili srodnu skupinu autoimunskih bolesti (sistemske reumatske bolesti, autoimune bolesti jetre) (23-25).

#### Pretrage komplementa

Laboratorijska dijagnostika sustava komplementa pridonosi dijagnostičkom postupku i praćenju kliničkog tijeka bolesti prvenstveno u bolestima kolagena (26-27). Temelji se na mjerenju njegove funkcionalne (hemolitičke) aktivnosti i mjerenju koncentracije pojedinih komponenti te njihovih proteolitičkih i razgradnih fragmenata (26). Urođeni nedostatak ili neaktivnost stanovitih komponenti (C1, C2, C4) povezana je sa sistemskim reumatskim bolestima, a nedostatak C3 i terminalnih komponenti povezan je s većom podložnošću bakterijskim infekcijama. Stečene deficijencije komplementa odlikuje nedostatak ili smanjena količina više komponenti istodobno prvenstveno u bolesnika s autoimunim bolestima (bolesti "imunokompleksa") i u bolesnika sa smanjenom biosintezom komplementarnih komponenti.

#### HLA-tipizacija

Općenito, HLA-tipizacija nije rutinski postupak u dijagnostici autoimunskih bolesti (28). HLA je najpolimorfniiji genski sustav u čovjeka. Laboratorijsko određivanje HLA-polimorfizma naziva se tipizacija tkiva. Izvodi se na dvije razine-antigenskoj i genskoj. Antigeni HLA određuju se serološkom metodom

(testom mikrolimfocitotoksičnosti) koja daje uvid u polimorfizam na razini membranskih proteina. Geni HLA određuju se metodama molekularne biologije temeljene na lančanoj reakciji polimeraze (PCR, prema engl. *Polymerase Chain Reaction*). Molekularna tipizacija omogućuje odrediti i polimorfizam unutar gena (tipizacija visoke rezolucije). Velik broj autoimunskih bolesti vezana je za pojedine haplotipove molekula HLA.

Relativni rizik (RR) od pojave određene autoimunske bolesti razlikuje se iako se pojavljuju u bolesnika s istim haplotipovima HLA što upućuje na kompleksni mehanizam ekspresije bolesti. Suvremena molekularna tipizacija sustava HLA na razini DNA otkriva da je predispozicija za pojavu određene autoimunske bolesti posljedica kompleksne interakcije gena za podložnost i protektivnih gena unutar istog serološkog haplotipa HLA. Zaključno se može reći da serološka i molekularna tipizacija sustava HLA može biti značajan dodatno dijagnostički parametar u slučajevima nejasne kliničke dijagnoze ili ako potvrda genetičke predispozicije, uz sve ostale dijagnostičke parametre, potvrđuje dijagnozu bolesti. Tipizacija HLA omogućuje i određivanje rizične populacije što može biti od praktične koristi u sprječavanju bolesti.

#### Imunodijagnostika sistemskih autoimunskih bolesti

Imunodijagnostika sistemskih reumatskih bolesti temelji se na detekciji ANA (22-23). To je velika skupina autoantitijela koja prepoznaje raznovrsne jezgrine autoantigene i prvenstveno su karakteristična za sistemske autoimunske bolesti. Za razliku od organspecifičnih autoimunskih bolesti koje karakterizira jedno autoantitijelo, odnosno autoantigen, sistemne autoimunske bolesti karakterizira određeni profil autoantitijela, odnosno autoantigena (29-31). Indirektna imunofluorescencija (IIF) na Hep-2 stanicama je metoda izbora u pretraživanju seruma radi detekcije ANA (Tablica 6). Pozitivan nalaz IIF obvezuje da se dokaže ciljni autoantigen jer su mnogi od njih karakteristični za stanovitu autoimunsu bolest. Valja imati na umu

da se stanovita serumska autoantitijela mogu detektirati prije kliničke ekspresije bolesti (29-30). U slučaju negativne IIF nije nužno određivati ciljne autoantigene, ali je itekako važno imati na umu da IIF ne otkriva neka važna autoantitijela, primjerice autoantitijela protiv CCP. Testovi ELISA, imunoblot i imunotest s mikrokuglicama najčešće se rabe za dokazivanje specifičnih autoantigena. Laboratorijski nalaz za ANA sadrži obrazac IIF, titar autoantitijela, primjerice protiv ds-DNA i koncentraciju ciljnih autoantigena (31).

Autoantitijela protiv raznih fosfolipida (aPL) prvenstveno definiraju primarni antifosfolipidni sindrom (PAPS), a karakteriziraju i kliničke manifestacije antifosfolipidnog sindroma koji se javlja u sistemnim reumatskim bolestima (sekundarni antifosfolipidni sindrom-SAPS). U serumu bolesnika najčešće se nađu autoantitijela protiv kardiopina (aCl), β2-glikoproteina I (β2-GPI), protrombina i lupus antikoagulansa (32-33). SAPS se ciljano dijagnosticira u imunodijagnostičkom postupku autoimunih reumatskih bolesti i reumatoidnog artritisa.

#### Imunodijagnostika sistemskih vaskulitisa

Laboratorijska imunodijagnostika sistemskih vaskulitisa temelji se na detekciji antineutrofilnih citoplazmatskih antitijela (ANCA) (34). Ona prepoznaju raznovrsne bjelančevine u granulama polimorfonuklearnih leukocita. IIF na etanolom fiksiranim ljudskim granulocitima je standardna metoda za detekciju ANCA. Dijagnostički su važna tri obrasca imunofluorescencije: "klasični" citoplazmatski (C-ANCA); perinuklearni (P-ANCA) i "atipični" perinuklearni (a/P-ANCA). ELISA i IB rabe se za dokazivanje specifičnih ciljnih autoantigena. Ciljni autoantigen za C-ANCA je proteinaza 3 (PR3-ANCA) a za P-ANCA mijeloperoksidaza (MPO-ANCA). PR3-ANCA i MPO-ANCA su autoantitijela na kojima se temelji laboratorijska dijagnostika sistemskih vaskulitisa malih krvnih žila i idiopatskih glomerulonefritisa. Karakteristična su za aktivnu i sistemsku bolest, a titar im korelira s ak-

tivnošću bolesti i s uspješnošću terapije. Čini se da mogu poslužiti i u kliničkom praćenju bolesnika. Naime, ponovna pojava ili povišenje titra autoantitijela upućuje na egzacerbaciju bolesti.

#### Imunodijagnostika autoimunskih bolesti jetre i crijeva

Imunodijagnostika autoimunih bolesti jetre i crijeva zasniva se na detekciji različitih autoantitijela (35). Primarnu bilijarnu cirozu (PBC) karakteriziraju anti-mitochondrijska antitijela (AMHA) koja prepoznaju autoantigene u kompleksu piruvatne dehidrogenaze (PDC-E2) i ANA koja prepoznaju specifične jezgrine antigene (gp 210, Sp100). Autoimuni hepatitis (AIH) karakteriziraju ANA, antitijela protiv glatke muskulature (AGLM), a/P-ANCA, autoantitijela protiv mikrosoma jetre i bubrega -1 (LKM-1), autoantitijela protiv jetrenog citosolnog antigena tip 1 (LC-1) te autoantitijela protiv jetrenog topljivog antigena (SLA). AGLM, ANA protiv jezgrenih lamina i a/P-ANCA karakteristična su za AIH tip1, antitijela protiv LKM-1 i LC-1 karakteriziraju AIH tip 2, a antitijela protiv SLA donedavno su se smatrala specifičnim za AIH tip 3 (35).

Autoantitijela protiv parijetalnih stanica (APS), endomizija (EMA), Sacharomyces cerevisiae (ASCA) i a/P-ANCA služe u imunodijagnostičkom postupku bolesnika s autoimunim bolestima crijeva. Atipična a/P-ANCA i ASCA pomažu u diferencijalnoj dijagnozi ulceroznog kolitisa (UC) i Crohnove bolesti (CD), APS u razlikovanju autoimunog gastritisa (AG) i perniciozne anemije (PA) te EMA protiv tkivne transglutaminaze (tTg) u dijagnostici celijakije (CE) (16).

#### Imunodijagnostika autoimunskih neuromuskularnih bolesti

Imunodijagnostika autoimunih neuromuskularnih bolesti zasniva se na detekciji autoantitijela protiv raznih glikolipida (gangliozida) poprečnoprugaste muskulature (StrAb), acetilkolinških receptora, neuronskih antitijela i antitijela protiv mijelinskih autoantigena (36-37).

### Imunodijagnostika autoimunskih bolesti endokrinih žlijezda

Laboratorijska detekcija karakterističnih autoantitijela i njihovih ciljnih autoantigena u bolesnika s autoimunskim bolestima endokrinih žlijezda zapravo pridonosi etiopatogenetskom razumijevanju hipo- odnosno hiperfunkcije dotične žlijezde (38-39).

### Racionalni pristup laboratorijskoj dijagnostici imunoloških poremećaja - laboratorijska imunologija u Hrvatskoj

Ovdje dolazimo na početne postavke, odnosno na pitanje racionalne laboratorijske dijagnostike imunoloških poremećaja. Držimo da ćemo se svi složiti s činjenicom da nema neracionalne dijagnostike sve dok postoje opravdane indikacije za imunološko testiranje, što je u slučaju imunodeficijencija i od neposrednog životnog pitanja! To nadalje znači da jedno od ključnih pitanja imunološke dijagnostike de facto predstavlja sama mogućnost izvođenja pojedinih imunoloških pretraga u našim zdravstvenim ustanovama i centrima. Naime, dok se pojedini segmenti imunološke dijagnostike izvode u nekoliko hrvatskih centara, složenija dijagnostika još uvijek je ograničena na nekoliko složenih testova koji se svaki zasebno izvode u par centara, dok se neki važni testovi uopće niti ne rade u našoj zemlji! Stoga na ovom mjestu smatramo uputnim još jednom skrenuti pozornost na potrebu pokretanja šire inicijative za boljom organizacijom i unaprjeđenje kvalitete laboratorijske imunologije kao struke koja je zamišljena kao partner i savjetnik kliničkim strukama.

U tom je pogledu od izuzetne važnosti za našu zemlju nedavno priznanje i uvrštenje laboratorijske imunologije kao jedne od punopravnih liječničkih specijalizacija prema Pravilniku o specijalističkom usavršavanju doktora medicine koje je 2011. donijelo Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi *Republike Hrvatske* (40). Jedna od osnovnih kompetencija budućih laboratorijskih imunologa jest "dati znanstvene osnove za laboratorijsku dijagnozu, liječenje i praćenje bolesti s imunopatogenetskim mehanizmom (kao i) dati liječničko mišljenje o preven-

ciji, dijagnozi, liječenju i praćenju bolesti s imunopatogenetskim mehanizmom". Nadamo se da će ova inicijativa uroditi plodom i da ćemo u narednom ciklusu moći zaista razgovarati o "racionalizaciji imunoloških pretraga".

#### LITERATURA

1. Turgeon M. Immunology & Serology in Laboratory Medicine, 4th Edition, Mosby, 2008.
2. Moore RA. Evidence-based clinical biochemistry. Ann Clin Biochem. 1997; 34: 3-7.
3. Batinić D. Laboratorijska dijagnostika imunodeficijenjskih sindroma. Paediatr Croat 2005; 49 (1): 39-47.
4. de Vries E, for the Clinical Working Party of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Patient-centred screening for primary immunodeficiency: a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists. Clin Exp Immunol. 2006; 145: 204-14.
5. de Vries E, in collaboration with European Society for Immunodeficiencies (ESID) members. Patient-centred screening for primary immunodeficiency, a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists: 2011 update. Clin Exp Immunol 2011; 167: 108-19.
6. de Vries E, Driessen G. Primary immunodeficiencies in children: a diagnostic challenge. Eur J Pediatr. 2011; 170: 169-77.
7. Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL et al. International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. J Allergy Clin Immunol. 2007; 120: 776-94.
8. International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies, Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Hammartröm L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck J, Roifman C, Seger R, Wedgwood J. Primary immunodeficiencies: 2009 update. J Allergy Clin Immunol. 2009; 124 (6): 1161-78.
9. Folds JD, Schmitz JL. Clinical and laboratory assessment of immunity. J Allergy Clin Immunol 2003; 111 (2): 702-11.
10. Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. Nat Med. 2001; 7: 899-905.
11. Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. Nature. 2005; 435: 590-7.
12. Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. Horror autoinflammaticus: the molecular

pathophysiology of autoinflammatory disease. Ann Rev Immunol. 2009; 27: 621-68.

13. Davis KB, Wen H, Ting JP-Y. The inflammatory NLRs in immunity, inflammation and associated disease. Ann Rev Immunol. 2011; 29: 707-35.
14. De Sanctis S, Nozzi M, Del Toro M et al. Autoinflammatory syndromes: diagnosis and management. Italian Journal of Pediatrics. 2010; 36: 57.
15. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IV. Roitt's Essential Immunology, 12th Edition, Wiley-Blackwell, 2011.
16. Malenica B. Autoimunost i imunopatogeneza autoimunih bolesti. U: Imunodijagnostika sistemskih autoimunih bolesti, Malenica B, ur., Medicinska naklada, Zagreb, 2006; 1-14.
17. Sinusas K. Osteoarthritis: diagnosis and treatment. Am Fam Physician. 2012; 85 (1): 49-56.
18. Malenica B. Laboratorijska imunodijagnostika reumatskih i autoimunih bolesti, te u transplantaciji tkiva i organa. U: Klinička kemija i molekularna dijagnostika, Sertić J i sur., (ur), Medicinska naklada, Zagreb, 2008; 160-85.
19. Malenica B. Laboratorijska imunodijagnostika alergija, vaskulitisa i sistemskih bolesti pluća. U: Imunologija i imunosne bolesti pluća. Benčić D, Batinić D, Malenica B i sur., Graphis, Zagreb, 2010; 115-40.
20. von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. Semin Arthritis Rheum. 1995; 24: 323-58.
21. Lyons R, Narain S, Nichols C, Satoh M, Reeves HW. Effective use of autoantibody test in the diagnosis of systemic autoimmune disease. Ann N Y Acad Sci. 2005; 1050: 217-28.
22. Stinton LM, Fritzler MJ. A clinical approach to autoantibody testing in systemic autoimmune rheumatic disorders. Autoimmun Rev. 2007; 7: 77-84.
23. Wiik AS. Anti-nuclear autoantibodies: clinical utility for diagnosis, monitoring and planning of treatment strategy in systemic immunoinflammatory diseases. Scand J Rheumatol. 2005; 34: 260-8.
24. Nifli A, Natas G, Mamoulaki M, Ni niraki M, Ampartzaki V, Theodoropoulos AP, Kohnitsky JM, Castanas E. Comparison of a multiplex bead-based fluorescent assay and immunofluorescence methods for the detection of ANA and ANCA autoantibodies in human serum. J Immunol Methods. 2006; 311: 189-97.
25. Tozzoli R. Recent advances in diagnostic technologies and their impact in autoimmune diseases. Autoimmun Rev. 2007; 6: 334-40.
26. Lin Ch-CH, Ahearn MJ. Complement in health and disease. In: Measuring Immunity. Basic Science and Clinical Practice. Lotze TM,

Thomson WS (eds), Elsevier Ltd, San Diego-London, 2005; 144-57.

27. Malenica B. Komplement i autoantitijela u alergijskim bolestima. U: Laboratorijska dijagnostika alergijskih bolesti. Dodig S, ur., Medicinska naklada, Zagreb, 2005; 57-64.
28. Žunec R. Tipizacija HLA u dijagnostici autoimunih bolesti: zašto i kada? U: Imunodijagnostika sistemskih autoimunih bolesti. Malenica B, ur., Medicinska naklada, Zagreb, 2006; 15-24.
29. Zhen LQ, Xie C, Wu T Mackay M, Aranow C, Putterman C, Mohan C. Identification of autoantibody clusters that best predict lupus disease activity using glomerular proteome arrays. J Clin Invest. 2005; 115: 3425-39.
30. Arbuckle MR, McCain MT, Rubestone MV. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. N Engl J Med. 2003; 349: 1526-33.
31. Bizzaro N. Autoantibodies as predictors of disease. Autoimmun Rev. 2007; 6: 325-33.
32. Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N. Interpretative comments on autoantibody tests. Autoimmun Rev. 2007; 6: 341-6.
33. Alessandri C, Conti F, Pendolino M, Mancini R, Valesini G. New autoantigens in the antiphospholipid syndrome. Autoimmun Rev. 2011; 10: 609-16.
34. Malenica B, Rudolf M, Kozmar A. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): Diagnostic utility and potential role in the pathogenesis of vasculitis. Acta Dermatovenerol Croat. 2004; 12: 294-313.
35. Bogdanos PD, Invernizzi P, Mackay RJ, Vergani D. Autoimmune liver serology: Current diagnostic and clinical challenges. World J Gastroenterol 2008; 14: 3374-87.
36. Khanna S, Reed AM. Immunopathogenesis of juvenile dermatomyositis. Muscle Nerve. 2010; 41 (5): 581-92.

### Summary

#### RATIONAL APPROACH TO LABORATORY DIAGNOSTICS OF IMMUNE DISORDERS

D. Batinić, B. Malenica

*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 various immune disorders, including immunodeficiencies, autoimmune diseases and hypersensitive reactions. The capacity to evaluate immune system has progressed along with the advances in understanding of the functioning of the immune system and development of modern technologies. However, during the last decade the number of requests for immunological testing has dramatically increased mainly due to inadequate knowledge of the analytical performance of immunological tests and lack of compliance to common diagnostic guidelines. Therefore, this situation warns both clinicians and laboratory immunologists to comply with the laboratory diagnostic guidelines proposed by international expert teams and to start communicate more closely in order to solve everyday routine.*

Descriptors: IMMUNE DISORDERS, LABORATORY DIAGNOSTICS, PROTOCOLS

Primljeno/Received: 14. 3. 2012.

Prihvaćeno/Accepted: 4. 4. 2012.