

IMMUNOFENOTYP DOJRZAŁYCH KOMÓREK HEMATOPOETYCZNYCH – PIERWOTNE I WTÓRNE NIEDOBORY

IMMUNOPHENOTYPE OF MATURE HEMATOPOIETIC CELLS –
PRIMARY AND SECONDARY IMMUNODEFICIENCIES

Anna PITUCH-NOWOROLSKA

Zakład Immunologii Klinicznej, Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii,
Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński

Streszczenie: W pracy przedstawiono charakterystykę leukocytów krwi obwodowej i węzłów chłonnych z oceną immunofenotypów, podaniem zmienności związanej z wiekiem. W rozdziale o niedoborach odporności przedstawione zostały pierwotne niedobory wraz z opisem zmian w obrębie proporcji populacji leukocytów ocenianych metodą cytometrii przepływowej. Omówiono szerzej te niedobory, w których badania immunofenotypu komórek krwi obwodowej i węzłów chłonnych stanowi podstawę rozpoznania.

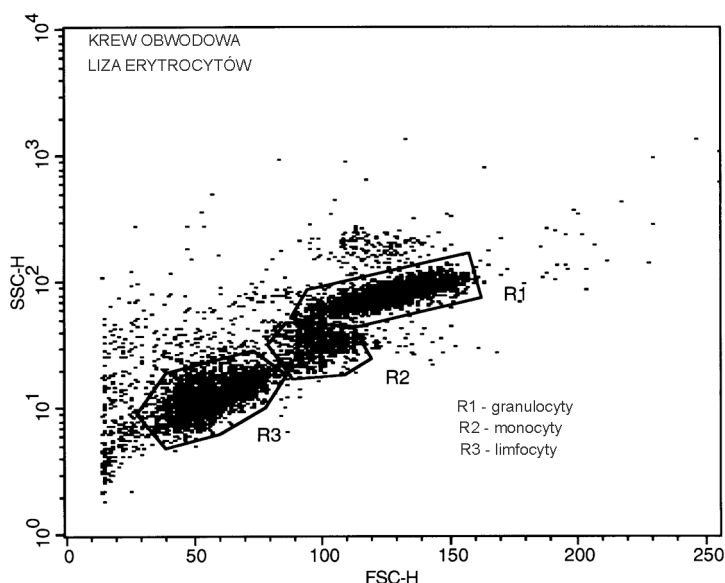
Summary: The leukocytes characteristics from peripheral blood and lymph nodes including age-related changes were shown. Primary immunodeficiencies were described based on quantitative changes within lymphocytes T and B populations assayed with flow cytometry. Immunodeficiencies with diagnosis based on analysis of peripheral blood and lymph node cells' immunophenotypes were discussed.

1. OCENA OBECNOŚCI I IMMUNOFENOTYPU POPULACJI KOMÓRKOWYCH

Krew obwodowa

W warunkach fizjologicznych we krwi obwodowej obecne są następujące populacje komórkowe wyodrębnione na podstawie właściwości fizyko-chemicznych:

- małe ziarniste komórki odpowiadające granulocytom, w tym również niewielka populacja najbardziej ziarnistych komórek czyli granulocytów kwasochłonnych,
- małe komórki nieziarniste odpowiadające limfocytom,
- średniej wielkości komórki o niewielkiej ilości ziarnistości odpowiadające monocytom, komórkom NK.

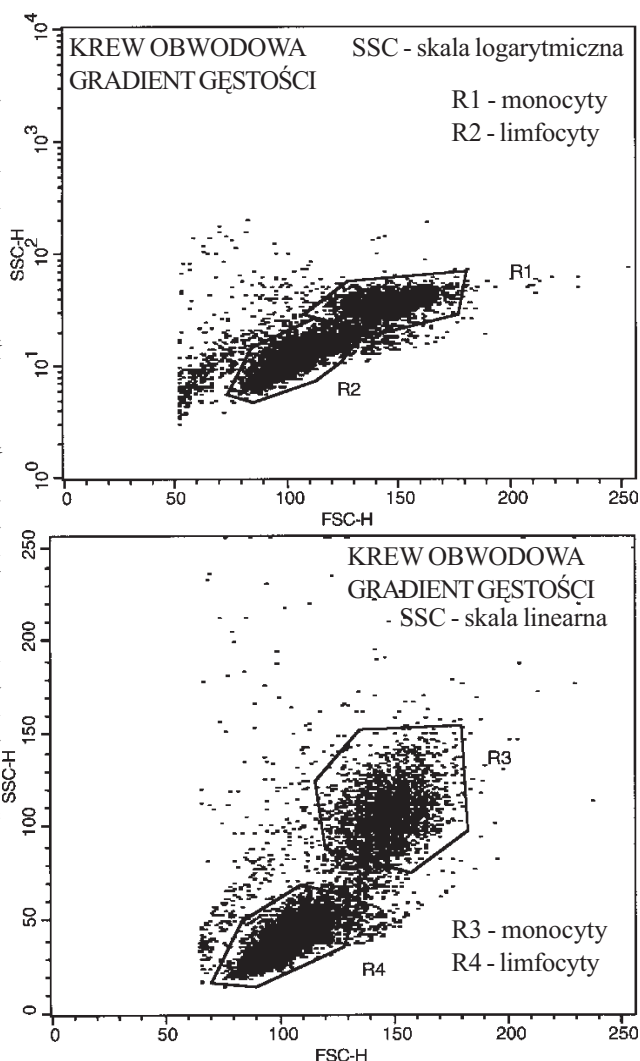


RYCINA 1. Populacje komórek krwi obwodowej po lizie erytrocytów. Rozkład punktowy (*dot plot*) oparty na parametrach SSC i FSC ukazuje populacje komórek różniące się cechami fizycznymi – wielkością i rozbudową powierzchni odzwierciedlającą ilość ziarnistości. Wyraźnie widoczne są komórki małe, skąpoziarniste odpowiadające limfocytom (bramka R3), nieco większe i bardziej ziarniste monocyty (R2) oraz największa ilościowo populacja granulocytów wielojądrzastych (R1). Proporcje granulocytów do limfocytów zmieniają się z wiekiem i u dzieci do 3 roku życia przeważają limfocyty, a u starszych dzieci i osób dorosłych – granulocyty

Ponadto we krwi obwodowej stwierdza się komórki występujące w odsetku niższym niż 1% (populacje śladowe). Należą do nich granulocyty zasadochłonne, plazmocyty, komórki dendrytyczne, macierzyste komórki hematopoetyczne, czasami pojedyncze komórki śródbłonkowe i inne korzystające z krwi jako drogi transportowej do miejsca docelowego. Do takich komórek należą np. komórki nowotworowe, prekursorowe w stanach zapalnych.

W cytometrze przepływowym zależnie od ustawienia na wykresie punktowym o osiach FSC i SSC rozkład tych populacji komórek obecnych we krwi obwodowej jest różny (ryc. 1). W przypadku poszukiwania i analiz np. populacji śladowych o parametrach odpowiadających populacji limfoidalnej bardziej korzystne wydaje się zastosowanie skali logarytmicznej FSC aniżeli liniowej. Przygotowanie zawiesiny komórkowej jest również zależne od celu analizy. Istnieją dwie podstawowe metody badania komórek krwi obwodowej. Jedna polega na barwieniu komórek w pełnej krwi, a następnie lizie erytrocytów. W pozostającej po lizie zawieszynie komórek do badania pozostają wszystkie populacje krwinek białych łącznie z granulocytami. Drugi sposób polega na nieciągłym gradencie gęstości, po którym w interfazie pozostaje zawieszyna komórek jednojądrzastych pozbawiona erytrocytów i granulocytów. Metody te są stosowane zależnie od potrzeb, ale w praktyce laboratoryjnej w celach porównawczych powinna być stale używana jedna z tych metod, gdyż wyniki badań tej samej zawiesiny komórkowej zależnie od metody mogą się nieco różnić zwłaszcza w ocenie odsetka danej populacji komórkowej.

RYCINA 2. Sposób pokazania obecnych populacji komórkowych. Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej uzyskano poprzez nieciągły gradient gęstości. Pobrana na EDTA krew obwodowa po rozcieńczeniu 1:1 solą fizjologiczną zostaje nawarstwiona na limfoprep (Ficoll/Isopaque) i wirowana (400 g przez 20 min). Po gradiencie w interfazie pozostają komórki jednojądrzaste, a erytrocyty i granulocyty opadają poniżej warstwy limfoprepu na dno próbówki. Komórki zebrane z interfazy, stanowią mieszaninę limfocytów, monocytów, komórek NK. Ustawienie parametru SSC w skali logarytmicznej pozwala na lepsze uwidocznienie populacji limfocytarnej. Taki układ parametrów można polecić do badania tych właśnie komórek np. w diagnostyce białaczek i chłoniaków. Ustawienie skali linearnej parametru SSC pozwala na uwidocznienie lepsze populacji monocytarnej i granulocytarnej (na rycinie tej populacji komórek nie ma). To ustawienie jest powszechnie używane, a jego mankamentem może być położenie populacji limfocytarnej jako ciasnej chmury komórek bliskiej linii. Aby te komórki uwidocznili, należy zmienić poziom czułości SSC tak, aby kosztem chmury granulocytarnej wyraźnie pokazać całą populację limfocytną.



Populacja limfocytów zawiera zarówno limfocyty T, jak i B. Stanowi ona wyraźnie odgraniczoną populację komórek małych pozbawionych ziarnistości łatwą do bramkowania na podstawie parametrów FSC i SSC. W wielokolorowej cytometrii podstawą selekcji populacji limfocytów T jest obecność na powierzchni komórek CD3, a limfocytów B – CD19 i/lub CD22.

Zestaw przeciwciał wykorzystywany do oceny populacji limfocytów zawiera przeciwciała pozwalające na szybką i wstępną analizę (CD45, CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD7, CD19, CD16+CD56, CD14) populacji limfocytów T i limfocytów B, monocytów oraz komórek NK (ryc. 2). Analiza pozwalająca na charakterystykę immunofenotypową i częściowo funkcjonalną subpopulacji limfocytów T oparta jest na wykorzystaniu znacznej ilości pozwalających na ocenę ekspresji determinant związanych z różnicowaniem i funkcją tych komórek, przykład takiej listy do trójkolorowej analizy zawiera tabela 1.

TABELA 1. Zestawienia przeciwciał monoklonalnych używane do określenia immunofenotypu limfocytów krwi obwodowej

Przeciwciało FITC	Przeciwciało RPE	Przeciwciało sprzężone z 3. fluorochromem	Identyfikowana subpopulacja	Uwagi
CD15 CD5	CD14 CD19	CD45 CD3	Kontrola "bramki" limfocytarnej Limfocyty T: CD3+ Limfocyty B: D5+/CD19,CD5-/CD19	Często w zestawieniu bez CD15
CD4 CD4 CD8 CD4 CD8 CD25 TRC α/β CD7 CD8 CD38 CD10 sIgM kappa	CD8 CD45RA CD45RA CD45RO CD45RO HLA-DR TRC γ/δ CD16/CD56 CD16/CD56 HLA-DR CD20 CD22 lambda	CD3 CD3 CD3 CD3 CD3 CD3 CD3 CD3 CD19 CD19 CD19 CD19	Limfocyty T: CD3/CD4 i CD3/CD8 Limfocyty T: CD3/CD45RA Limfocyty T: CD3/CD45RO Marker aktywacji limfocytów T Limfocyty T: α/β i γ/δ Komórki NK Komórki NK Limfocyty B Limfocyty B: prekursorzy CD10+	U dzieci śladowa populacja CD5+ CD38 – marker komórek prekursorowych

Odsetki i ilości limfocytów T i B, komórek NK, granulocytów i monocytów w warunkach prawidłowych zależnie od wieku i płci

W tabeli 2 i 3 pokazano proporcje odsetkowe i ilości komórek należących do poszczególnych populacji w zależności od wieku. Obecnie często określa się obecność populacji limfocytów T podwójnie ujemnych (CD3+/CD4/CD8-) we krwi obwodowej. Wzrost odsetkowy tej populacji obserwuje się w okresach infekcji bakteryjnej, wirusowej. Opisano również niedobór odporności komórkowej polegający na wysokim odsetku tych limfocytów T krążących we krwi (tab. 2).

Komórki NK stanowią około 10% populacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej. Ich liczba wzrasta w trakcie infekcji głównie wirusowych, aczkolwiek niektóre wirusy (np. wirus Epstein-Barr) prowadzą do długotrwałego obniżenia liczby komórek NK, co jest związane z objawami zespołu przewlekłego zmęczenia (*chronic fatigue syndrome*). Obecnie w wielu badaniach podkreśla się zaburzenia ekspresji determinant (np. CD16) na powierzchni komórek NK, ale kliniczne znaczenie tych zaburzeń nie jest jednoznacznie ustalone.

Monocyty należą do komórek prezentujących antygeny i stąd ich główna rola w układzie odporności. Krytycznym dla prezentacji przetworzonych antygenów jest ekspresja determinant HLA-DR. W stanach przewlekłych infekcji, rekonwalescencji po ciężkich infekcjach wirusowych we krwi mogą występować różne subpopulacje monocytów włącznie z prekursorami i komórkami aktywowanymi. Odpowiednio będą się one różniły immunofenotypami (np. w ekspresji CD14, CD64, CD16).

TABELA 2. Zestawienia odsetkowe subpopulacji limfocytarnych T we krwi obwodowej u noworodka, dziecka 1-rocznego i osoby dorosłej

Populacja limfocytów	Noworodek (%)	6 miesięcy (%)	12 miesięcy (%)	Dorosły (%)
Limfocyty T: CD3	79 (58–89)	72 (50–78)	65 (50–73)	72 (60–83)
Subpopulacje CD3+				
TCR α/β	97 (94–99)	95 (90–97)	92 (88–98)	93 (83–97)
TCR γ/δ	2 (0–3)	4 (1–6)	4 (2–8)	5 (2–15)
CD4	76 (69–87)	56 (34–64)	50 (30–62)	58 (52–69)
CD8	25 (13–31)	15 (8–32)	16 (8–34)	33 (27–46)
CD45 RA	79 (52–90)	80 (64–90)	80 (72–88)	60 (46–71)
CD45 RO	26 (16–65)	15 (13–71)	16 (9–54)	56 (48–71)
CD4/CD45RA	76 (41–88)	82 (72–91)	80 (65–97)	49 (35–70)
CD8/CD45RA	84 (67–97)	89 (84–94)	89 (81–100)	73 (55–80)
CD4/CD45RO	26 (17–73)	15 (13–90)	16 (11–65)	63 (47–81)
CD8/CD45RO	16 (5–43)	13 (5–65)	15 (7–41)	46 (38–59)
CD3/HLA-DR	3 (1–27)	3 (2–6)	3 (2–7)	28 (3–45)
CD25	13 (10–21)	9 (6–11)	8 (6–10)	27 (19–36)

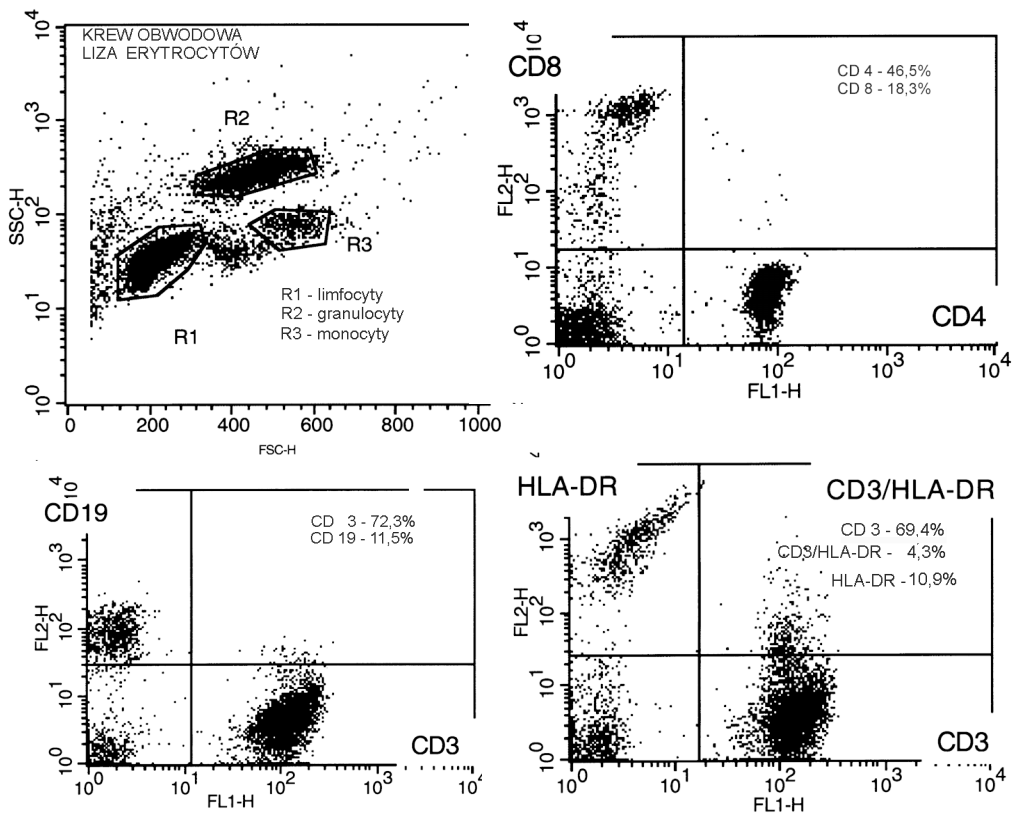
Opracowano na podstawie: *Immunophenotyping of lymphocytes in healthy and immunodeficient children*. Esther de Vries, Immunologie, Rotterdam 1999

Węzły chłonne

Węzły chłonne stanowią struktury tkanki limfatycznej i są zasiedlone tylko przez limfocyty – w rejonach korowych i częściowo rdzennych przez limfocyty T, natomiast tzw. ośrodki rozrodcze przez limfocyty B aktywowane zależnie od potrzeb, czyli produkcji swoistych przeciwciał i immunoglobulin. W centrach rozrodczych stwierdza się również obecność plazmacytów i komórek histiocytarnych. Proporcje pomiędzy limfocytami T i B są zależne od stanu funkcjonalnego danego węzła chłonnego (w okresach aktywacji wzrasta wyraźnie odsetek limfocytów B, a w zakażeniu np. prątkiem guźlicy są to prawie wyłącznie limfocyty T) oraz jego lokalizacji anatomicznej. Najczęściej badane są węzły chłonne szyjne, pachowe, nadobojczykowe i w warunkach fizjologicznych limfocyty T stanowią 50–70% wszystkich komórek, a resztę stanowią limfocyty B. Proporcje te nieznacznie zmieniają się z wiekiem – u dzieci w okresie „bujania” tkanki łącznej (3–7 lat) wyższy jest odsetek limfocytów B (50–60%). W okresach pobudzenia (przewlekłe zakażenia bakteryjne regionu, z którego limfa spływa do badanego węzła chłonnego) przeważają limfocyty B, często wykazujące ekspresję determinant prekursorowych, co jest dodatkowo oznaką pobudzenia centrów rozrodczych. Natomiast budowa i proporcje komórkowe węzłów chłonnych pachwinowych (węzeł Rosen-Millera) i krezkowych są inne (np. wykazują wyższy odsetek komórek CD45, CD3, CD19 ujemnych), co powoduje, że diagnostyka zmian chorobowych jest znacznie trudniejsza (ryc. 3).

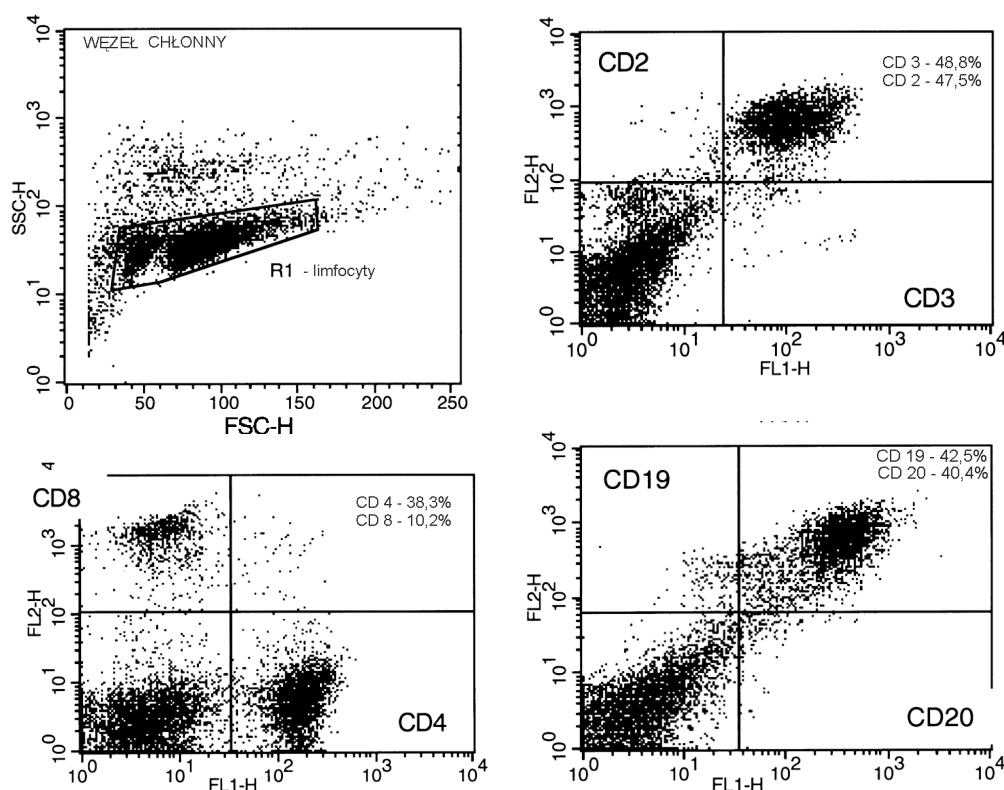
Błony śluzowe – MALT

W obrębie błon śluzowych – MALT (*mucous associated lymphoid tissue*) znajdują się komórki układu odporności w dwóch zasadniczych strukturach –



RYCINA 3. Krew obwodowa – leukocyty uzyskane metodą lizy erytrocytów. Widoczne są komórki odpowiadające limfocytom, monocytom i granulocytom. Jest jeszcze populacja (R4) która stanowi mieszaninę limfocytów, komórek NK, pojedynczych monocytoów. U zdrowego dziecka (5 lat) w populacji limfocytarnej (R1) limfocyty T stanowią około 70%, proporcja między subpopulacją CD4 a CD8 jest zachowana (2,5), limfocyty B stanowią 11,5%. Limfocyty T cytotoksyczne (CD8) wykazują silną ekspresję determinanty CD8 (ok. 10³). Komórki o pośredniej i niskiej ekspresji należą do populacji komórek NK. Równoczesne barwienie tych komórek przeciwciałem dla CD3 i HLA-DR pozwala na ocenę odsetka komórek wykazujących tylko ekspresję HLA-DR (limfocyty B) oraz równoczesną ekspresję CD3 i HLA-DR (aktywowane limfocyty T)

odpowiednikach węzłów chłonnych, czyli kępkach Peyera w przewodzie pokarmowym oraz w formie luźnej tkanki limfatycznej. Populacja limfocytów T składa się z limfocytów T wspomagających (Th) w 70% oraz supresyjnych (Ts) w 30–35%. Ze względu na szczególną rolę spełnianą przez limfocyty T znajdujące się w obrębie MALT, a związaną z odpowiedzią swoistą na liczne antygeny odsetek limfocytów T pamięci sięga 50%, a aktywowanych – 35%. Populacja limfocytów B wykazuje na powierzchni głównie obecność łańcuchów ciężkich IgM (sIgM) oraz IgD (sIgD), co odpowiada limfocytom naiwnym (55%). Populacja limfocytów B sIgM+ bez ekspresji IgD, co odpowiada limfocytom B pamięci, stanowi pozostałe 45%. Proces zmiany izotypu immunoglobulin (*switch*) prowadzi do powstania populacji dojrzałych limfocytów B



RYCINA 4. Komórki węzła chłonnego. Zawiesinę komórek uzyskuje się poprzez mechaniczne rozdrobnienie fragmentu węzła chłonnego. W pokazanym rozkładzie punktowym widoczne są w obrębie bramki (R1) dwie populacje komórek – mniejsze i większe stanowiące ilościową większość. Obydwie populacje są limfocytami. W badanym węźle limfocyty T stanowiły około 48%, w tym 38% – limfocyty T CD4, a 10% – limfocyty CD8. Dojrzałe limfocyty B stanowią około 42%, wszystkie wykazują ekspresję CD19, CD20, CD22 (niepokazane) oraz immunoglobulin o proporcji łańcuchów lekkich κ/λ – 2:1. Poza bramką pozostały niewielkie ilości komórek o charakterystyce granulocytów, trochę resztek po uszkodzonych komórkach (detritus komórkowy). Te granulocyty, niekiedy trochę monocytów to komórki napływające z krwią do węzła chłonnego. Aby uzyskać zawiesinę limfocytów, należy wstępnie uzyskane komórki z węzła chłonnego poddać gradientowi gęstości. W węźle chłonnym w trakcie przewlekłego procesu zapalnego dochodzi do zmiany proporcji limfocytów T do B na rzecz tych ostatnich. Odsetek limfocytów B może osiągać nawet 70%, ale obecne są limfocyty B z łańcuchami lekkimi obydwu rodzajów (barwienie – CD19/kappa, CD19/lambda). Obecność łańcucha lekkiego tylko jednego rodzaju może sugerować rozrost monoklonalny

wykazujących obecność sIgA (50–60%). Są to limfocyty B i plazmocyty produkujące lokalnie dwucząsteczkowe IgA (tzw. sekrecyjne IgA). Produkcja w ścianie jelita obejmuje również produkcję elementu łączącego pojedyncze molekuly IgA. Sekrecyjne IgA jest odpowiedzialne za reakcje z antygenami obecnymi w błonie śluzowej.

TABELA 3. Zestawienie odsetkowe populacji limfocytarnych i ilości bezwzględne tych komórek we krwi obwodowej osób w różnym wieku

Populacja limfocytów	Dziecko 6 m-cy % (Ilość/ μ l)	12 miesięcy % (Ilość/ μ l)	2–5 lat % (Ilość/ μ l)	7–17 lat % (Ilość/ μ l)	Dorosły % (Ilość/ μ l)
Limfocyty T:					
CD3	71 (4030)	66(3300)	72 (3040)	70 (1800)	73 (1600)
CD4	45-79(3610-8840) 49 (2950)	53-81(1460-6450) 43(2070)	62-80 (1610-4230) 41(1800)	66-76 (1400-2000) 37(800)	61-84 (960-2600) 46 (940)
CD8	36-61(1690-4600) 24 (1450)	31-54(1020-3600) 25(1320)	35-51(900-2860) 30(1180)	33-41(700-1100) 30 (800)	32-60 (540-1660) 27 (520)
Stosunek CD4:CD8	16-34 (650-2450) 2,2 (1,3–3,5)	16-38(570-230) 1,6(1,0-3,0)	630-1910 1,4(1,0-2,4)	27-35 (600-900) 1,3 (1,1-1,4)	13-40 (270-930) 1,7 (0,9-4,5)
Limfocyty B: CD19 i/lub CD20	23 (900)	23 (900)	24 (900)	16 (400)	13 (246)
	19-31(500-1500)	19-31(500-1500)	21-28(700-1300)	12-22 (300-500)	10-31(122-632)
Komórki NK:					
CD16	12,7 (790 +/-352)	12,5 (714 +/-300)	12,9 (573 +/- 264)	15,2 (408+/-196)	15,5 (318 +/- 191)
CD56	10,6 (627+/-308)	12,2 (676 +/- 296)	13,1 (586 +/- 310)	16,5 (438 +/- 181)	16,4 (343 +/- 214)

Opracowano na podstawie: *Immunodeficiency disorders, General considerations. E.R. Stiehm, H.D. Ochs, A Winkelstein*

2. EKSPRESJA MOLEKUŁ ZWIĄZANYCH Z FUNKCJĄ LIMFOCYTÓW T I B

W zapoczątkowaniu odpowiedzi immunologicznej na antygen odgrywa rolę aktywacja limfocyty T składająca się z dwóch etapów – pierwszego sygnału i wytworzenia synapsy immunologicznej pomiędzy limfocytym T a komórką prezentującą antygen oraz drugiego sygnału, w którym najistotniejsze są tzw. cząstki kostymulujące. Po procesie aktywacji i odpowiedzi na swoisty antygen wytwarza się pamięć immunologiczną. Limfocyty T pamięci mają inny immunofenotyp w porównaniu z limfocytami T naiwnymi (dziewiczymi).

CD45RA – występują głównie na populacji dziewiczych limfocytów T. Tylko niewielki odsetek tych limfocytów T wykazuje ekspresję CD45RO. Ta ostatnia determinanta jest charakterystyczna dla limfocytów T pamięci.

CD25 – receptor dla interleukiny 2 (IL-2). Występuje na aktywowanych limfocytach T. Jest związany z produkcją IL-2 przez limfocyty T po aktywacji drugim sygnałem po kontakcie z antygenem.

HLA-DR – występuje na limfocytach B i monocytach bez względu na stan aktywacji. Na limfocytach T występuje po aktywacji i rozpoczęciu odpowiedzi immunologicznej. Aktywowane limfocyty B wykazują zwiększoną ekspresję HLA-DR w porównaniu ze spoczynkowymi limfocytami B.

TCR α/β – jest stwierdzane na 95% limfocytów T. Heterodimer łańcuchów α/β reaguje z antygenem w początkowych stadiach odpowiedzi limfocytów T.

TCR γ/δ – we krwi obwodowej stanowią mniej niż 5% limfocytów T, a w populacji MALT – 5–10%. Uważa się, że limfocyty T γ/δ mają zdolność rozpoznawania antygenów nieprzetworzonych przez komórki prezentujące antygen. Limfocyty TCR γ/δ biorą udział w odpowiedzi przeciwwakacyjnej i przeciwnow-

TABELA 4. Zestawienia ciężkich skojarzonych niedoborów odporności

Typ niedoboru	Poziom immunoglobulin	Limfocyty B ilość	Limfocyty T ilość	Typ dziedziczenia	Uwagi
1. T-B+ SCID: a/ X-linked (niedobór γ c) b/ brak JAK3 c/ brak IL7receptora d/ brak CD45	Obniżony	Prawidłowa lub podwyższona	Znacznie obniżona	XL* AR**	obniżona ilość NK -"
2. T-B-SCID a/ niedobór RAG1/2 b/ niedobór ARTEMIS c/ niedobór ADA d/ dysgenезja siateczki	Obniżony	Znacznie obniżona	Znacznie obniżona	AR AR AR AR	NK prawidłowe prawidłowe limfocyty Tgd
3. zespół Omenn'a	Obniżony, Wzrost IgE	Prawidłowa lub obniżona (brak)	Obecne (aktywowane)	AR	granulocytopenia, małopłytkowość erythrodermia, eozynofilia, hepatosplenomegalia
4. zespół hiper IgM (sprzężony z pćią)	Wzrost IgM, niskie IgG, IgA	Obecne tylko IgM+, IgD+	Prawidłowe	XL	granulocytopenia, małopłytkowość, infekcje oportunistyczne
5. brak CD40	Wzrost IgM, niskie IgG, IgA	Obecne IgM+, IgD+	Prawidłowe	AR	granulocytopenia
6. niedobór determinant MHC klasy II	Prawidłowe lub obniżone	Prawidłowe	Prawidłowe lub obniżone CD4	AR	
7. niedobór ZAP-70 r	Prawidłowe	Prawidłowe	Prawidłowe CD4, obniżone CD8	AR	
8. niedobór TAP-1, TAP-2	Prawidłowe	Prawidłowe	Prawidłowe CD4, obniżone CD8	AR	brak ekspresji determinant MHC klasy I
Niedobory immunoglobulin					
1. choroba Brutona (agammaglobulinemia)	Niski lub brak	Pojedyncze lub brak	Prawidłowe	XL	ciężkie bakteryjne infekcje
2. agammaglobulinemia	Niski lub brak	Pojedyncze lub brak	Prawidłowe	AR	ciężkie bakteryjne infekcje

Opracowano na podstawie: *Primary immunodeficiency diseases: an update. Clin. Exp. Immunol.*, 2003, 132, 9-15

tworowej. Większość limfocytów T γ/δ należy do populacji CD8, a tylko niewielki odsetek jest CD4. W obrębie MALT limfocyty T γ/δ odgrywają istotną rolę jako komórki regulacyjne zapobiegając uogólnionej odpowiedzi na antygeny pokarmowe.

TH1 i TH2 są to funkcjonalne subpopulacje limfocytów T (głównie Th) różniące się przede wszystkim profilem produkowanych cytokin.

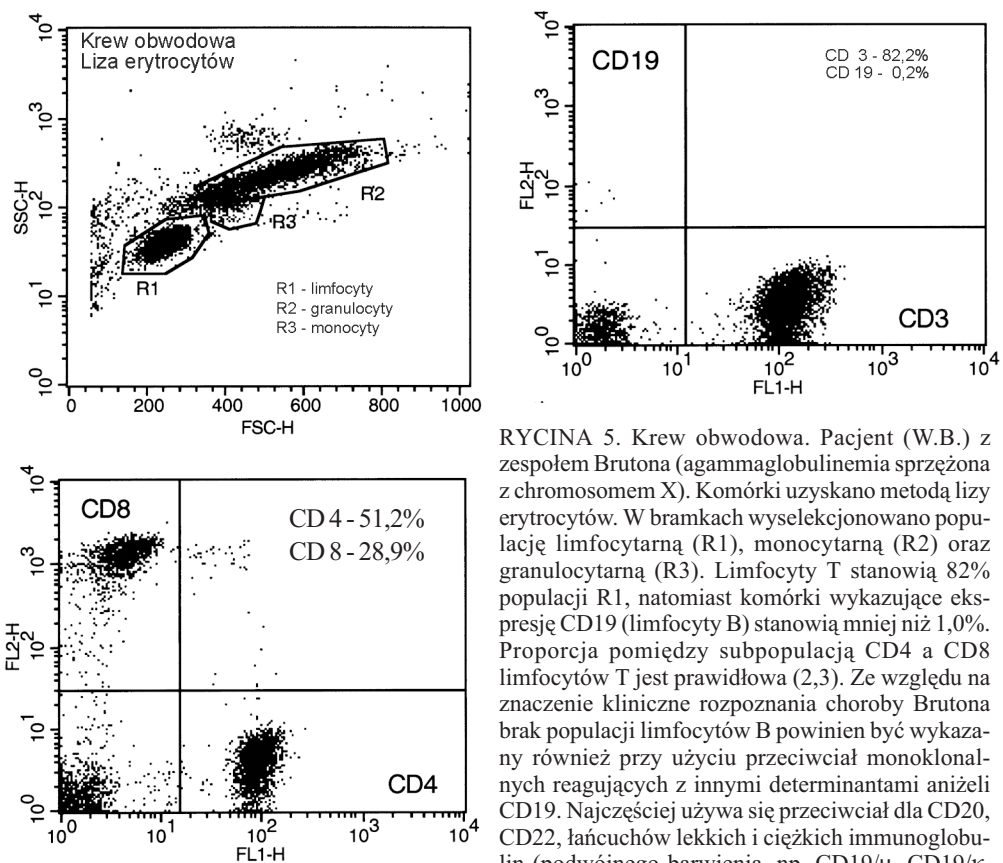
3. PIERWOTNE NIEDOBORY ODPORNOŚCI

Ze względu na możliwości cytometrii przepływowej jako metody diagnostycznej przedstawiono tylko te niedobory odporności, w których określenie ilości i proporcji poszczególnych populacji komórek krwi obwodowej oraz ocena ich immunofenotypu ma znaczenie dla diagnostyki i monitorowania przebiegu choroby. Do niedoborów odporności, w których dochodzi do zaburzeń ilościowych (brak określonej populacji

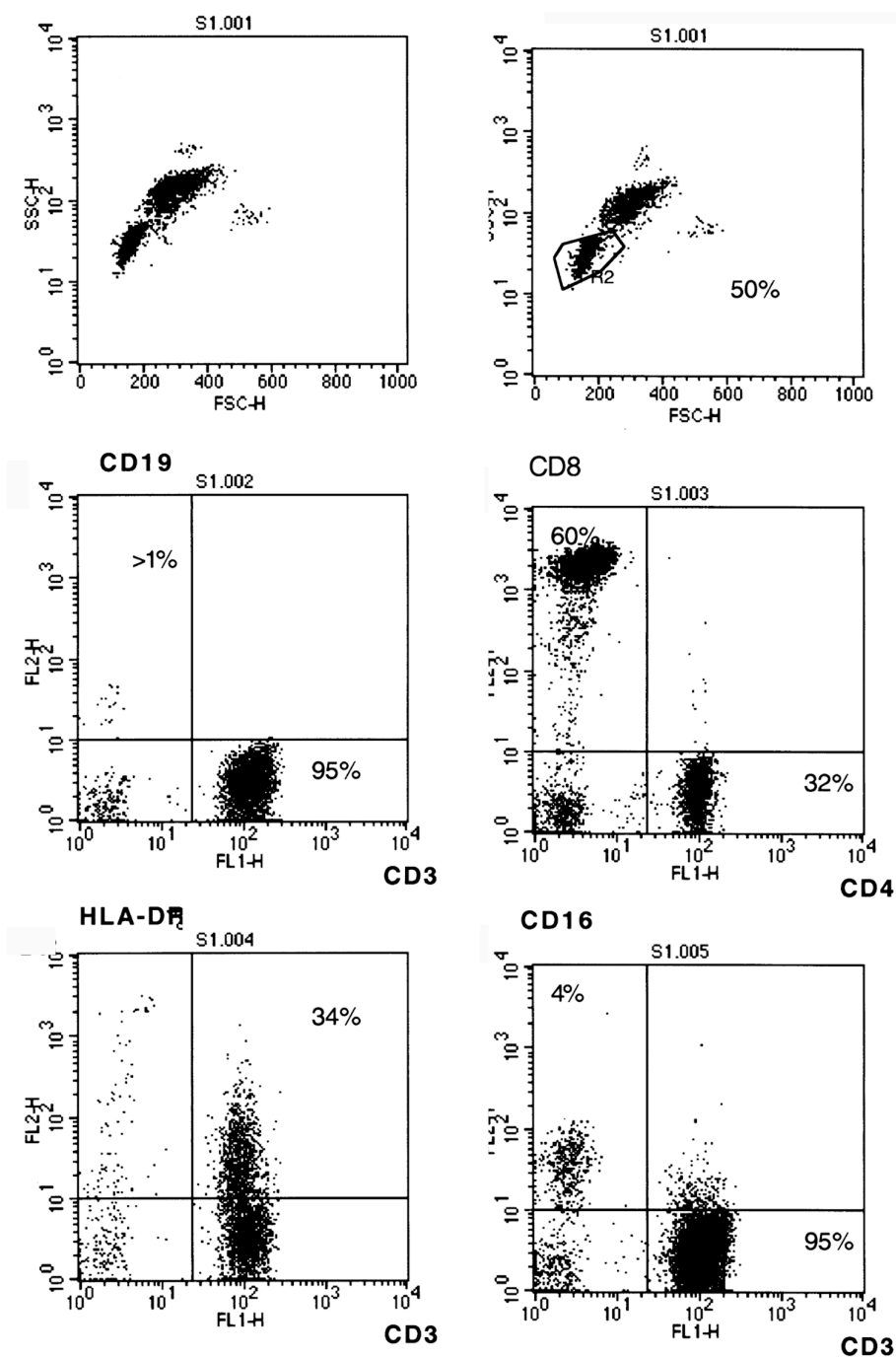
komórek), należą ciężkie skojarzone niedobory odporności (SCID) oraz niedobory z przewagą zaburzeń odporności humoralnej (np. agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X, jak i dziedziczona recesywnie autosomalnie, zespół hiper IgM – ryc. 5, 6, 7) i komórkowej (np. zespół DiGeorge'a, niedobór ZAP70 – obecnie wliczany przez niektórych do grupy SCID). Drugą grupą niedoborów, w których cytometria przepływowa jako metoda diagnostyczna jest przydatna, są zaburzenia ekspresji określonych determinant, receptorów itp. Do takich niedoborów należą m.in. zespół LAD (brak ekspresji molekuł adhezyjnych), brak ekspresji determinant układu MHC klasy II oraz niedobór TAP-1, TAP-2 (brak ekspresji MHC klasy I), grupa niedoborów związanych z brakiem ekspresji CD40 i CD40L (CD154), receptorów dla interferonu, IL-12.

Ciężkie skojarzone niedobory odporności

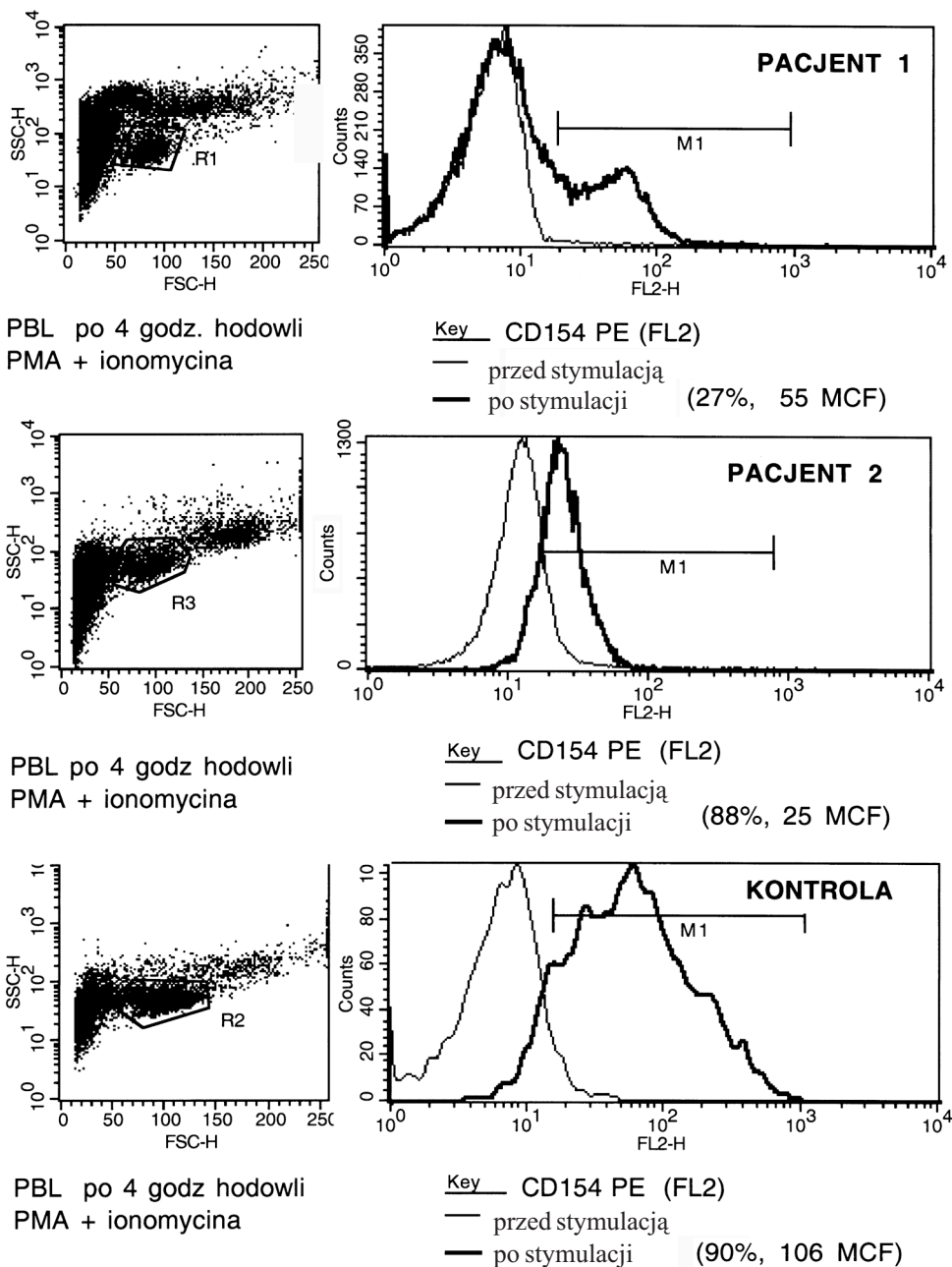
W tabeli 4 zestawiono wybrane skojarzone niedobory odporności, w których dochodzi do braku określonej populacji komórek rozwijających się w szpiku. Dużą grupę zróżnicowanych klinicznie ciężkich skojarzonych niedoborów stanowią zespoły



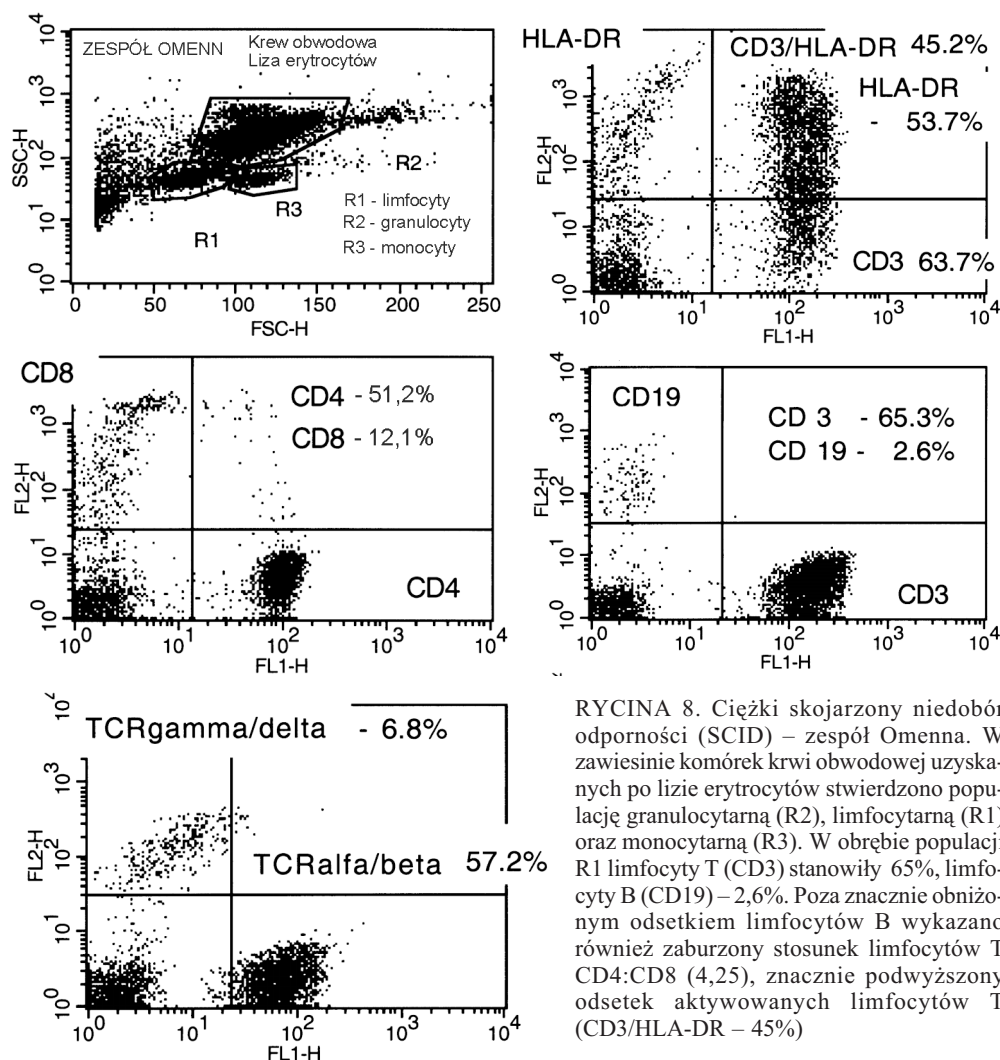
RYCINA 5. Krew obwodowa. Pacjent (W.B.) z zespołem Brutona (agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X). Komórki uzyskano metodą lizy erytrocytów. W bramkach wyselekcjonowano populację limfocytarną (R1), monocytarną (R2) oraz granulocytarną (R3). Limfocyty T stanowią 82% populacji R1, natomiast komórki wykazujące ekspresję CD19 (limfocyty B) stanowią mniej niż 1,0%. Proporcja pomiędzy subpopulacją CD4 a CD8 limfocytów T jest prawidłowa (2,3). Ze względu na znaczenie kliniczne rozpoznania choroby Brutona brak populacji limfocytów B powinien być wykazany również przy użyciu przeciwciał monoklonalnych reagujących z innymi determinantami aniżeli CD19. Najczęściej używa się przeciwciał dla CD20, CD22, łańcuchów lekkich i ciężkich immunoglobulin (podwójnego barwienia, np. CD19/ μ , CD19/ κ , CD19/ λ)



RYCINA 6. W badaniach limfocytów krwi obwodowej (bramka R2) u chorego (Sz.D.) z agammaglobulinemią wykazano zaburzenia proporcji limfocytów CD4:CD8 oraz podwyższony odsetek aktywowanych limfocytów T (wykazujących ekspresję HLA-DR, CD25). Jest to często związane z przewlekłymi i nawracającymi zakażeniami bakteryjnymi

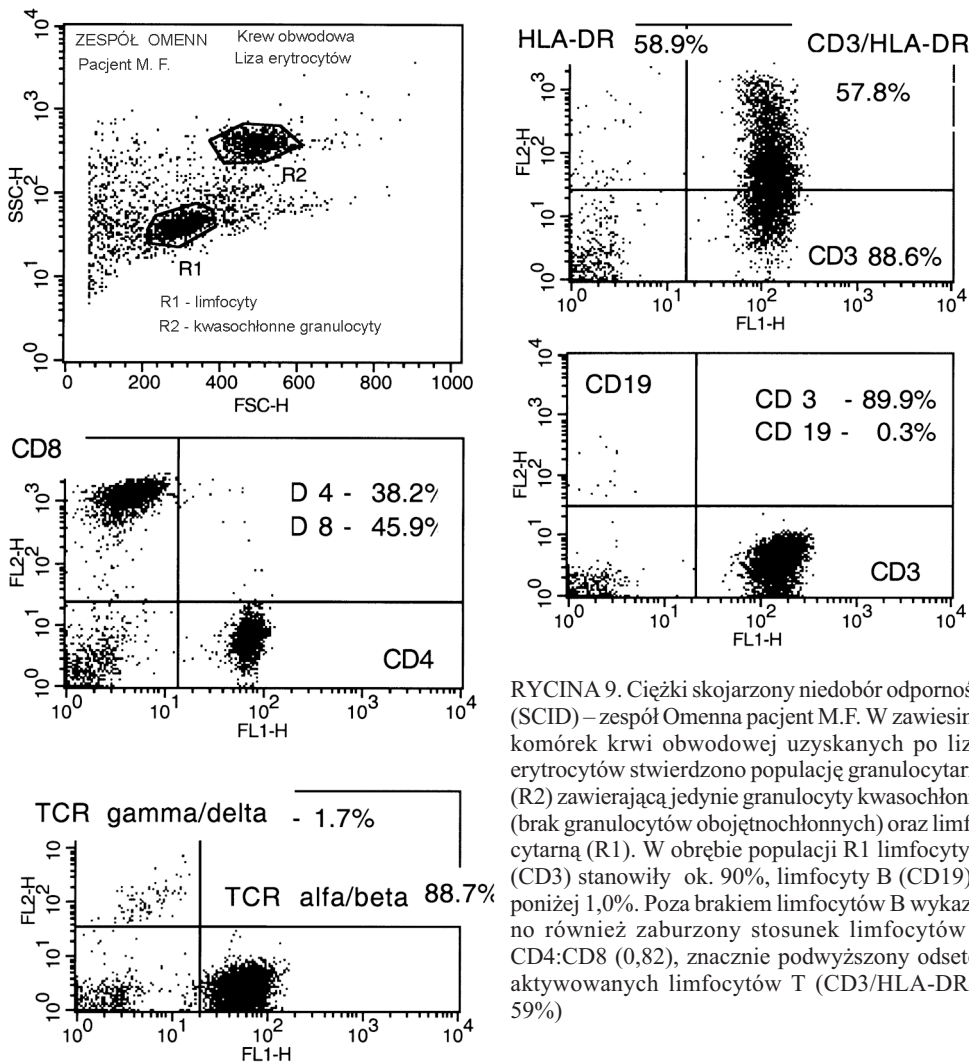


RYCINA 7. Ekspresja ligandu dla CD40 (CD154) na komórkach zdrowego dawcy (kontrola) i 2 pacjentów z zespołem hiper IgM. Limfocyty T pacjenta 1 po stymulacji wykazują tylko 27% komórek z indukowalną ekspresją CD154. Limfocyty pacjenta 2 wykazują indukowalną ekspresję CD154 w wysokim odsetku (88%), ale ilość cząsteczek przypadająca na komórkę jest niewielka (niski wskaźnik MCF). Limfocyty zdrowego dawcy odpowiadają na stymulację wysokim odsetkiem komórek i odpowiednio wysokim wskaźnikiem MCF dla ekspresji CD154



RYCINA 8. Ciężki skojarzony niedobór odporności (SCID) – zespół Omenna. W zawiesinie komórek krwi obwodowej uzyskanych po lizie erytrocytów stwierdzono populację granulocytarną (R2), limfocytarną (R1) oraz monocytarną (R3). W obrębie populacji R1 limfocyty T (CD3) stanowiły 65%, limfocyty B (CD19) – 2,6%. Poza znacznie obniżonym odsetkiem limfocytów B wykazano również zaburzony stosunek limfocytów T CD4:CD8 (4,25), znacznie podwyższony odsetek aktywowanych limfocytów T (CD3/HLA-DR – 45%)

charakteryzujące się brakiem populacji limfocytów T we krwi obwodowej, co jest związane nie tylko z zaburzeniem szpikowej hematopoezy, ale i obecnością funkcji grasicy. Wstępną sugestię takiego niedoboru u dziecka (noworodka, niemowlęcia) można wysunąć na podstawie oceny obrazu odsetkowego leukocytów w badaniu morfologii. Zaburzenie proporcji limfocytów i granulocytów na rzecz granulocytów, często znaczne przesunięcie w stronę form młodych związane z zakażeniem bakteryjnym może wskazywać na konieczność szczegółowego badania ilościowego i jakościowego tych komórek. W ocenie komórek węzłów chłonnych i grasicy również nie stwierdza się zasiedlenia rejonów związanych z obecnością limfocytów T. U tych dzieci węzły chłonne i grasicą stanowią resztkową tkankę łączną. Niewielką ilościowo populację komórek o charakterystyce limfoidalnej stanowią limfocyty B, które i tak nie mogą spełniać swojej funkcji. Wykazanie obniżenia lub braku

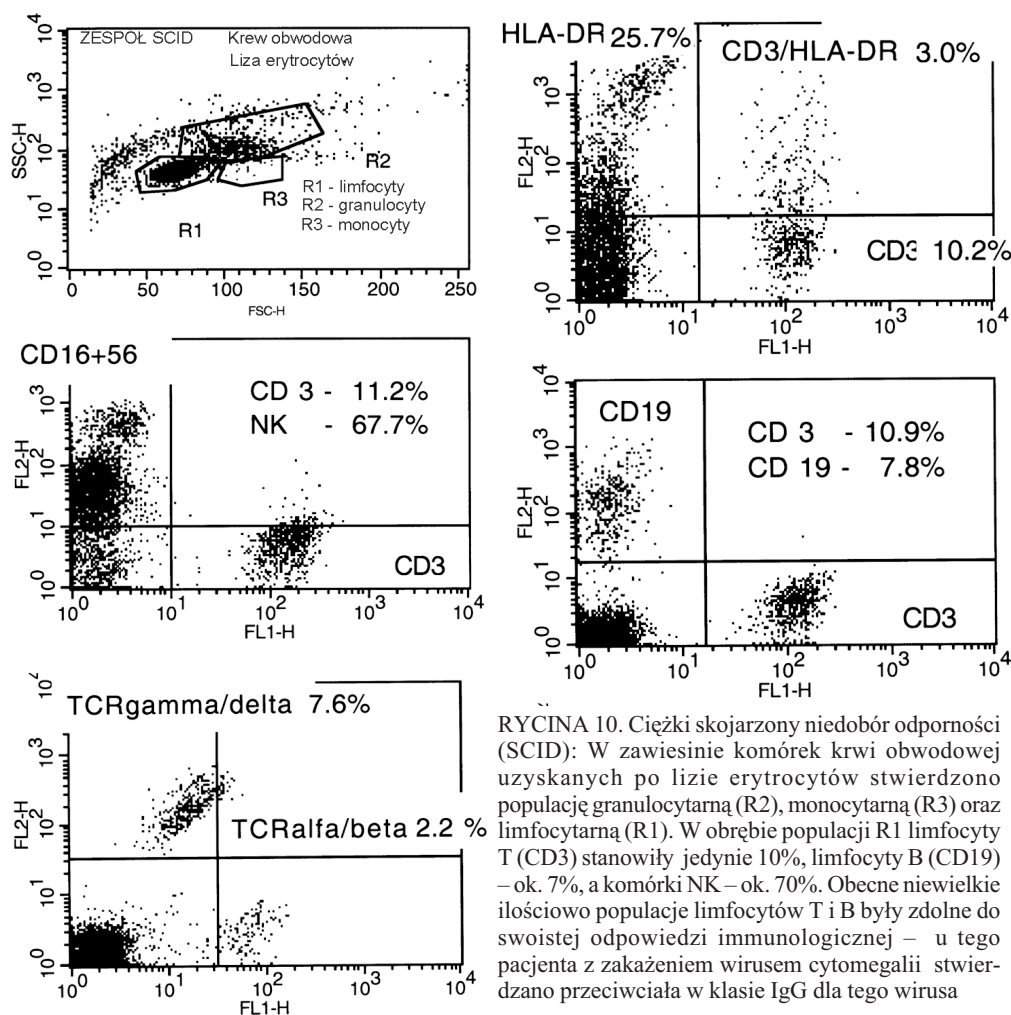


RYCINA 9. Ciężki skojarzony niedobór odporności (SCID) – zespół Omenna pacjent M.F. W zawiesinie komórek krwi obwodowej uzyskanych po lizie erytrocytów stwierdzono populację granulocytarną (R2) zawierającą jedynie granulocyty kwasochłonne (brak granulocytów obojętnochłonnych) oraz limfocytarną (R1). W obrębie populacji R1 limfocyty T (CD3) stanowiły ok. 90%, limfocyty B (CD19) – poniżej 1,0%. Poza brakiem limfocytów B wykazano również zaburzony stosunek limfocytów T CD4:CD8 (0,82), znacznie podwyższony odsetek aktywowanych limfocytów T (CD3/HLA-DR – 59%)

limfocytów T, a często również i B we krwi obwodowej jest podstawą potwierdzenia wstępnego klinicznego rozpoznania SCID.

W jednej z odmian SCID populację prawidłowych limfocytów T i B zastępują komórki NK. Trudności z wczesną diagnostyką polegają na tym, że w obrazie krwi w podstawowym badaniu morfologii proporcje granulocytów i „limfocytów” (komórki NK) mogą być zachowane. Natomiast w ocenie immunofenotypu stwierdza się obecność wysokiego odsetka komórek NK, a prawidłowe limfocyty T i B stanowią często jedynie populacje resztkowe. Obecnie znane są genetyczne zmiany związane z patogenezą i wykazanie w badaniach molekularnych tych zmian stanowi podstawę klasyfikacji danego niedoboru.

W ocenie zaburzeń sugerujących zespół SCID istotne jest wykonanie badania przynajmniej dwukrotnie, gdyż może się zdarzyć nasilona odpowiedź szpikowa na stan



RYCINA 10. Ciężki skojarzony niedobór odporności (SCID): W zawiesinie komórek krwi obwodowej uzyskanych po lizie erytrocytów stwierdzono populację granulocytarną (R2), monocytarną (R3) oraz limfocytarną (R1). W obrębie populacji R1 limfocyty T (CD3) stanowiły jedynie 10%, limfocyty B (CD19) – ok. 7%, a komórki NK – ok. 70%. Obecne niewielkie ilościowo populacje limfocytów T i B były zdolne do swoistej odpowiedzi immunologicznej – u tego pacjenta z zakażeniem wirusem cytomegalii stwierdzano przeciwciała w klasie IgG dla tego wirusa

zakażenia, posocznicy, a znaczne obniżenie odsetka limfocytów jest zjawiskiem przejściowym. Równie krytycznie należy analizować wzrost odsetka komórek NK, który może być związany z zakażeniem, np. wirusem cytomegalii, a nie obrazem zespołu SCID. Powtórne badanie za kilka dni, często w innej sytuacji klinicznej (poprawa stanu dziecka) może pomóc w rozstrzygnięciu tych wątpliwości. Najczęściej jednak obraz kliniczny, brak obecności węzłów chłonnych, cienia grasicy, wywiad rodzinny jednoznacznie wskazują na zespół skojarzonego niedoboru odporności, co ułatwia analizę, a przed wszystkim interpretację zaburzeń komórkowych we krwi obwodowej.

Do SCID należy również zespół Omenna, który ma bardzo charakterystyczny obraz kliniczny (erythrodermia, powiększenie węzłów chłonnych, wątroby, śledziony, często przewlekłe biegunki). W badaniu morfologii typowa jest wysoka liczba leukocytów (hiperleukocytoza) oraz wysoki odsetek granulocytów kwasochłonnych.

W ocenie immunofenotypowej komórek krwi obwodowej stwierdza się obecność dodatkowej populacji komórek ziarnistych (granulocyty kwasochłonne), a w populacji limfocytarnej często obniżony odsetek lub brak limfocytów B. Limfocyty T przeważają, proporcje pomiędzy subpopulacjami tych komórek są zachowane. Stwierdza się cechy aktywacji, co przejawia się tym, że większość, a w niektórych przypadkach wszystkie limfocyty T wykazują ekspresję HLA-DR, CD25. W ciężkich postaciach zespołu Omenna mogą być dodatkowe zaburzenia hematopoezy, np. dyserytropoeza, agranulocytoza. W węzłach chłonnych nie stwierdza się centrów rozrodczych w ocenie histologicznej, a limfocytów B w badaniach populacji komórkowych węzła chłonnego w cytometrze (ryc. 8 i 9).

Innym dobrze określonym niedoborem odporności komórkowej, w którym dominuje brak populacji limfocytów T jest anomalia DiGeorge'a. Jest to zespół wad związanych z zaburzeniem rozwoju trzeciej i czwartej kieszonki skrzelowej. Do tego zespołu należą – wada serca (głównie dużych pni naczyniowych, tetralogia Fallota), brak przytarczyc (zaburzenia gospodarki wapniowej), niedorozwój lub brak grasicy (w konsekwencji brak limfocytów T), dysmorfia twarzy. W ocenie subpopulacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej populacja limfocytów jest zmniejszona, składa się głównie z limfocytów B. Istnieją postaci kompletnej i niekompletnej anomalii DiGeorge'a, a liczba limfocytów T może być różna od kilkunastu procent do prawie prawidłowej, proporcje pomiędzy subpopulacjami CD4 i CD8 zachowane. Potwierdzenie zespołu DiGeorge'a opiera się na wykazaniu typowych delecji w chromosomie 22, u części chorych w chromosomie 10. Podobny obraz obniżonego odsetka limfocytów T obserwuje się w zespole Nijmehen oraz innych zespołach, takich jak: ataksja-telangiektazja, zespół ataksjopodobny (mutacja genu Mre 11) należących do grupy związanej z niestabilnością chromosomów. W tych zespołach obraz kliniczny jest bardzo typowy i ocena populacji limfocytów jest jedynie pomocnicza.

W niedoborach z przewagą mechanizmów humoralnych ocena populacji limfocytów jest krytyczna dla rozpoznania agammaglobulinemii zarówno w postaci sprzężonej z chromosomem X (choroba Brutona), jak i znacznie rzadszej postaci o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym, w której chorują i chłopcy, i dziewczęta. Wykazanie bardzo niskiej liczby lub braku limfocytów B potwierdza inne wyniki badań, takie jak: brak immunoglobulin w surowicy, klinicznie obserwowane śladowe migdałki czy niewyczuwalne węzły chłonne u dziecka z ciężkim przebiegiem zakażeń bakteryjnych (ryc.5 i 6).

Znacznie częściej aniżeli agammaglobulinemię obserwuje się pospolity zmienny niedobór odporności (CVID) występujący w różnym wieku, u obu płci. W tym zespole podstawą rozpoznania jest obniżony poziom najczęściej IgG, ale towarzyszą temu u znacznego odsetka chorych zaburzenia proporcji limfocytów T CD4:CD8. Limfocyty B są obecne w ilości prawidłowej dla wieku, choć u części chorych ich liczba może być na dolnej granicy normy.

Zespół hiper-IgM występuje w formie sprzężonej z płcią (dziedziczony jako sprzężony z chromosomem X) oraz w formie dziedziczonej autosomalnie recesywnie. W postaci sprzężonej z chromosomem X na aktywowanych limfocytach T wspomagających (CD4) chorego nie udaje się stwierdzić ekspresji ligandu dla cząsteczki CD40 (CD154). Brak tego ligandu upośledza interakcję pomiędzy limfocytami T a

limfocytami B. W konsekwencji nie dochodzi do prawidłowego różnicowania limfocytów B i nie następuje zmiana izotypu wytwarzanych immunoglobulin. We krwi krążą limfocyty B wykazujące na powierzchni jedynie IgM i IgD. Ocena ekspresji CD40L wymaga procedury aktywacji komórek, równoległego hodowania komórek osoby zdrowej (jako kontrola), równoczesnego barwienia CD4, CD8. Wykazanie braku zmiany izotypu immunoglobulin polega na pokazaniu obecności jedynie łańcucha ciężkiego μ i δ na powierzchni limfocytów B, a braku obecności łańcucha ciężkiego γ , α , ϵ . Proporcja limfocytów B z IgM i łańcuchem lekkim κ do limfocytów B z łańcuchem lekkim λ jest zachowana.

4. WTÓRNE NIEDOBORY ODPORNOŚCI

Zmiany po infekcjach wirusowych

Infekcje wirusowe (np. wirus herpes, cytomegalii, Epsteina-Barr i odry, różyczki) powodują często obniżenie odsetka limfocytów Th (CD4), któremu towarzyszy brak odpowiedzi na stymulację mitogenami i antygenami. Zjawisko to jest przejściowe aczkolwiek u niektórych chorych zwłaszcza po przebyciu mononukleozy zakaźnej o ciężkim przebiegu zaburzenia w odporności komórkowej mogą trwać nawet kilka lat. Z obserwacji wiadomo, że wirus odry również prowadzi do przejściowego zaburzenia odpowiedzi na antygeny i przebieg zakażeń następujących niedługo po przebyciu odry może być ciężki i trudny do opanowania. Monitorowanie zaburzeń w proporcji subpopulacji limfocytów T oraz odpowiedzi limfocytów B na antygeny (np. szczepionki) pozwala na określenie, jak głębokie są to zaburzenia i jak długo trwały.

Niedobory związane z chemioterapią

Długotrwała chemioterapia prowadzi najczęściej do obniżenia odsetka limfocytów. W przypadku ostrych białaczek limfoblastycznych lub chłoniaków nieziarniczych z linii limfocytu B obniżenie liczby tych komórek może być bardzo znaczne (nawet poniżej 5%) i trwać stosunkowo długo (do kilku miesięcy). U niektórych chorych obserwuje się zjawisko odwrotne – wzrost liczby limfocytów B i ich prekursorów w szpiku, a czasem nawet we krwi obwodowej w niedługi czas po zakończeniu chemioterapii. Jest to tzw. „odbicie” (*rebound*). Taki obraz może sugerować wznowę ostrej białaczki limfoblastycznej z linii limfocytu B i wymaga częstej kontroli. Opisuje się, że wzrost liczby prekursorów i limfocytów B po zakończeniu leczenia może trwać do kilku miesięcy (ponad 6 miesięcy) bez objawów wznowy procesu rozrostowego. Po tym okresie następuje normalizacja.

W zakresie limfocytów T nie obserwuje się zjawiska „odbicia” natomiast może dość długo utrzymywać się zaburzenie proporcji limfocytów CD4:CD8. Obniżenie odsetka i liczby bezwzględnie limfocytów T CD4 może utrzymywać się ponad rok. Monitorowanie immunofenotypowe limfocytów T pozwala na określenie czasu normalizacji ilościowych proporcji pomiędzy subpopulacjami tych komórek. Osobnym zagadnieniem jest zaburzenie funkcji tych komórek, które utrzymuje się u niektórych chorych przez długi okres. Chorzy

ci po zakończeniu leczenia chemioterapią mogą wymagać stosowania dożylnych preparatów immunoglobulin jako leczenia wtórnego niedoboru odporności humoralnej.

AIDS

Ze względu na powszechną znajomość zmian w obrębie subpopulacji limfocytów T u chorych zakażonych wirusem HIV i w trakcie rozwijającego się zespołu AIDS wspominamy jedynie o tym, aby przypomnieć, że i w Polsce należy o tym zakażeniu pamiętać. Znaczne i postępujące spadki odsetka i ilości limfocytów CD4 u osób młodocianych i dorosłych zwłaszcza z grup ryzyka powinny być uzupełniane badaniami wirusologicznymi na obecność przeciwciał dla antygenów wirusa HIV. Monitorowanie chorych polega na systematycznej ocenie odsetka limfocytów CD4 i CD8 i określeniu bezwzględnie liczby limfocytów w każdej z tych subpopulacji.

5. ZASTRZEŻENIA I UWAGI DO OCENY ILOŚCIOWEJ I JAKOŚCIOWEJ (W TYM IMMUNOFENOTYPU) KOMÓREK IMMUNOKOMPETENTNYCH W DIAGNOSTYCE PIERWOTNYCH I WTÓRNYCH NIEDOBORÓW ODPORNOŚCI

Zastrzeżenie i problemy w tych badaniach są natury podstawowej i związanej z pierwotnymi niedoborami. Te podstawowe to możliwość uszkodzenia komórek tak, że ilość nieuszkodzonych jest niewielka, ekspresja determinant niska, zmienna lub nieobecna. Wniosek z takiego obrazu na ekranie cytometru (*dot plot* FSC/SSC lub CD45/CD3/CD19) jest jeden – powtórzyć badanie. W drugiej grupie problemów są takie, które wynikają z natury niedoborów, np. w niektórych postaciach SCID brakuje prawie całkiem populacji o charakterystyce limfocytarnej we krwi obwodowej. Problem jest tym większy, że najczęściej są to noworodki, niemowlęta lub małe dzieci o niskiej wadze, tak wyniszczone, że pobranie większych ilości krwi stanowi pewną trudność (np. może być wskazane przetoczenie napromieniowanej i ubogo leukocytarnej masy erytrocytarnej przed badaniami). Do zestawu przeciwciał dla leukocytów krwi obwodowej (zestawy firmowe) często trzeba dodać przeciwciała, np. dla komórek NK. Poszukiwanie komórek NK jest wskazane szczególnie wtedy, gdy komórki obecne w bramce limfocytarnej nie wykazują ekspresji determinant typowych dla limfocytów lub suma komórek o charakterystyce immunofenotypowej limfocytów T i B jest niska, np. około 40%.

Rozpoznanie pierwotnego niedoboru odporności jest rozpoznaniem ważnym dla chorego i lekarza, a najczęściej jest to rozpoznanie na całe życie. Standardy postępowania diagnostycznego sugerują wykonanie więcej niż tylko jednego badania i sprawdzenie wyniku np. stosując kilka przeciwciał dla limfocytów B, poszerzając panel przeciwciał dla aktywnych limfocytów T itd.

Możliwość uzyskania zawiesiny komórek do oceny immunofenotypu metodą lizy erytrocytów lub gradientu gęstości pozwala na uniknięcie problemów związanych z

trudnością wyodrębnienia poszczególnych populacji na podstawie parametrów SSC i FSC. Ponadto, obecnie dąży się do wykorzystania 3- i 4-kolorowej cytometrii, co pozwala na równoczesne barwienie badanych komórek przeciwciałem dla tzw. determinanty wyróżniającej np. dla limfocytów T – CD3, a dla limfocytów B – CD19 w każdej próbówce, w której są komórki barwione przeciwciałami dla innych determinant, np. CD4/CD8, CD20/CD22, łańcuchy lekkie kappa/lambda itp.

Diagnostyka pierwotnych i wtórnych niedoborów odporności jest istotna dla ustalenia rozpoznania, prowadzenia chorych (profilaktyka zakażeń, leczenie aktualnych infekcji), planowania leczenia perspektywicznego w tym również przeszczepienia szpiku jako metody trwałego wyleczenia w wielu niedoborach, zwłaszcza skojarzonych (np. SCID). Wprowadzanie szerokiego panelu przeciwciał do oceny immunofenotypu pozwala na bardziej precyzyjne określenie typu niedoboru, a w konsekwencji bardziej skuteczne leczenie.

LITERATURA

- [1] ALEMAN K, NOORDZIJ JG, DE GROOT R et al. Reviewing Omenn syndrome. *Eur J Pediatr* 2001; **160**: 718/0725.
- [2] BALLOW M. Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2002; **109**: 581–591.
- [3] CHAPEL H, GEHA R, ROSEN F. Primary immunodeficiency disease: an update. *Clin Exp Immunol* 2003; **132**: 9–15.
- [4] CONLEY MH, NOTARANGELO LD, ETZIONI A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. *Clinical Immunology* 1999; **93**: 190–197.
- [5] CUNNINGHAM-RUNDLES CH, BODIAN C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clinical Immunology* 1999; **92**: 34–48.
- [6] CUNNINGHAM-BUNDLES S, YEGER-ARBITMAN R, NACHMAN SA et al. New variant of MHC class II deficiency with Interleukin-2 abnormality. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; **56**: 116–123.
- [7] DANIELS JA, LEDERMAN HM, MAITRA A et al. Gastrointestinal tract pathology in patients with common variable immunodeficiency (CVID). A clinicopathologic study and review. *Am J Surg Pathol* 2007; **31**: 1800–1812.
- [8] ETZIONI A, OCHS HD. The hyper IgM syndrome - an evolving story. Review article. *Pediatric Research* 2004; **56**: 519–525.
- [9] GEHA RS, NOTARANGELO LD, CASANOVA J-L et al. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **120**: 776–794.
- [10] GILMOUR KC, WALSH D, HEATH S et al. Immunological and genetic analysis of 65 patients with a clinical suspicion of X linked hyper-IgM. *J Clin Pathol Mol Pathol* 2003; **56**: 256–262.
- [11] KATO M, KIMURA H, SEKI M et al. Omenn syndrome – review of several phenotypes of Omenn syndrome and RAG1/RAG2 mutations in Japan. *Allergy International* 2006; **55**: 115–119.
- [12] KILIC SS. Omenn's syndrome. Clinical article. *International Pediatrics* 2003; **18**: 41–42.
- [13] VAN KOOTEN C, BANCHEREAU J. CD40-CD40ligand. *J Leukoc Biol* 2000; **67**: 2–17.
- [14] LOPEZ-GRANADOS E, CAMBRONERO R, FERREIRA A et al. Three novel mutations reflect the variety of defects causing phenotypically diverse X-linked hyper-IgM syndrome. *Clin Exp Immunol* 2003; **133**: 123–131.
- [15] NOTARANGELO LD, HAYWARD AR. X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (XHIM). *Clin Exp Immunol* 2000; **120**: 399–405.
- [16] PAVELEC G, BUHRING HJ. Expression of MHC class II epitopes on human T cell lymphocyte clones. *Cellular Immunology* 1990; **127**: 520–526.

- [17] PITUCH-NOWOROLSKA A, KOWALCZYK D, MACURA-BIEGUN A et al. The clinical features of hyper IgM syndrome. A 4 cases report. *Clinical Immunol* 2007; **32**: 105–112.
- [18] PRIMARY IMMUNODEFICIENCY DISEASES. REPORT OF A WHO SCIENTIFIC GROUP. *Clin Exp Immunol* 1997; **109**: 1–28.
- [19] PUCK JM. Severe combined immunodeficiency: new advances in diagnosis and treatment. *Immunol Res* 2007; **38**: 64–67.
- [20] STENT G, IRVING L, LEWIN S et al. The kinetics of surface expression of CD11/CD18 integrins and CD54 on monocytes and macrophages. *Clin Exp Immunol* 1995; **100**: 366–376.
- [21] STIEHM ER, OCHS HD, WINKELSTEIN JA.[red.] Immunologic disorders in infants and children. 5th edition. Elsevier, 2004.
- [22] de VRIES E. Immunophenotyping of lymphocytes in healthy and immunodeficient children. Rotterdam 1999.
- [23] ZEMAN K. [red.] Zaburzenia odporności u dzieci. Biblioteka Pediatri. PZWL. 2002.
- [24] ZEMBALA M, GÓRSKI A. [red.] Zarys immunologii klinicznej. PZWL 2001.

Anna Pituch-Noworolska,
Zakład Immunologii Klinicznej, Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków
e-mail: mipituch@cyf-kr.edu.pl