

# Przegląd testów laboratoryjnych przydatnych w diagnostyce pierwotnych niedoborów odporności

## Review of laboratory tests using in diagnosis of primary immunodeficiency diseases

Edyta Brzustewicz, Ewa Bryl

Zakład Patologii i Reumatologii Doświadczalnej,  
Gdański Uniwersytet Medyczny

### STRESZCZENIE

Pierwotne niedobory odporności (PNO) obejmują grupę około 150 chorób, których patofizjologia dotyczyć może każdej składowej niespecyficznego i specyficznego odpowiedzi immunologicznej. Przy podejrzeniu PNO należy podjąć szereg badań dążących do ustalenia trafnej diagnozy, a badania laboratoryjne są nieodzownym ich elementem. Wyróżnić można testy podstawowe i specjalistyczne. Morfologia krwi z rozmazem mikroskopowym jest badaniem pierwszego rzutu. Inne testy pozwalają na ocenę odpowiedzi humoralnej, komórkowej, fagocytozy oraz układu dopełniacza. Rozwój nowoczesnych technik laboratoryjnych ułatwia postawienie trafnej diagnozy. Szczególną rolę odgrywa cytometria przepływową, która umożliwia ocenę ilościową i jakościową ekspresji określonych antygenów powierzchniowych, istotnych dla PNO. Technika ta wyparła także tradycyjne metody oceny funkcji fagocytów. Należy podkreślić również znaczenie immunogenetyki, jako dziedziny dynamicznie rozwijającej się. Częste nawracające zakażenia u pacjentów z PNO wymagają odpowiedniej diagnostyki mikrobiologicznej.

Forum Medycyny Rodzinnej 2014, tom 8, nr 1, 27–36

słowa kluczowe: pierwotne niedobory odporności, niedobory immunologiczne, immunodiagnostyka, cytometria przepływową, badanie układu odpornościowego

### ABSTRACT

Primary immunodeficiency diseases (PID) are heterogenous group of disorders including about 150 their different forms. These systemic disorders with multifactorial etiology can affect specific and nonspecific immune responses. The majority of PID arises from defects of B-cells development and function. However, some disorders are associated with defects in T cells, phagocytes or elements of complement system. Frequent recurrent infections can suggest PID and require diagnostic procedures, both basic and specialistic. The full blood count with microscopic smear is a first-line study. There are available numerous

Adres do korespondencji:  
dr hab. Ewa Bryl, prof. nadzw. GUMed  
Zakład Patologii i Reumatologii Doświadczalnej  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
ul. Dębinki 7, 80–210 Gdańsk  
e-mail: ebryl@gumed.edu.pl

Copyright © 2014 Via Medica  
ISSN 1897–3590

tests which assess B-cell, T-cell or combined T- and B-cell immunological functions. Some other basic mechanisms which play crucial role in pathomechanism of PID (phagocytosis, complement or cytokines functions) need to be investigated. Development of new advanced laboratory techniques helps to find accurate diagnosis. One of the most important method is flow cytometry, which allows the characterization of abnormalities of immune cells. We should underline growing role of immunogenetics in diagnosis and expanding our understanding of PID. There is also importance of early diagnosis and management of infectious complications, which can also be intricate in primary immunodeficiencies.

Forum Medycyny Rodzinnej 2014, vol 8, no 1, 27–36

**key words:** primary immunodeficiency diseases, immunodeficiencies, immunodiagnostics, flow cytometry, immune system testing

### WSTĘP

Pierwotne niedobory odporności (PNO) obejmują grupę chorób o zróżnicowanej etiologii i obrazie klinicznym. Patogeneza związana jest z zaburzeniami genetycznymi, które powodują upośledzenie składowych układu odpornościowego. W zależności od przewagi dysfunkcji konkretnego typu odpowiedzi Międzynarodowa Unia Towarzystw Immu-

nologicznych (IUIS, *International Union of Immunological Society*) w 2011 roku sklasyfikowała PNO w 8 kategoriach [1]:

- I. Złożone niedobory odporności.
- II. Inne dobrze zdefiniowane niedobory odporności.
- III. Niedobory z przewagą produkcji przeciwciał.
- IV. Choroby z dysregulacją odpowiedzi immunologicznej.
- V. Wrodzone zaburzenia komórek żernych.
- VI. Zaburzenia odporności wrodzonej.
- VII. Zaburzenia odpowiedzi zapalnej.
- VIII. Niedobory układu dopełniacza.

Każda z chorób w klasyfikacji IUIS została szczegółowo scharakteryzowana z uwzględnieniem między innymi sposobu dziedziczenia i częstości zachorowania. Pierwotne niedobory odporności dotyczyć mogą zarówno mechanizmów odpowiedzi swoistej (nabytej) jak i nieswoistej (wrodzonej). Na tej podstawie można dokonać uproszczonego podziału PNO (tab. 1).

Podstawowymi komórkami odpowiedzi swoistej są limfocyty T, związane z odpowiedzią komórkową i limfocyty B, warunkujące odporność humoralną. Nieprawidłowości na którymś z etapów różnicowania i dojrzewania tych komórek powodują powstawanie niedoborów odporności. Prawidłowa funkcja

**Tabela 1**

#### Uproszczony podział PNO uwzględniający wybrane choroby

| Typ zaburzeń  | Nazwa choroby  |
|---|--|
| <b>Zaburzenia odpowiedzi nabytej</b>                      |  |
| Z przewagą zaburzeń odporności humoralnej                 | Izolowany niedobór IgA   |
|   | Agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X (choroba Brutona) |
|   | Pospolity zmienny niedobór odporności (CVID)                   |
| Z przewagą zaburzeń odporności komórkowej                 | Zespół Di George'a   |
|   | Zespół Nezelofa  |
| Z upośledzeniem odpowiedzi typu komórkowego i humoralnego | Zespół Wiskotta-Aldricha                                       |
|   | Ataksja-teleangiektazja  |
|   | Ciężki złożony niedobór odporności (SCID)                      |
| <b>Zaburzenia odpowiedzi wrodzonej</b>                    |  |
| Zaburzenia komórek fagocytujących                         | Przewlekła choroba ziarniniakowa                               |
|   | Zespół Chediaka-Higashiego                                     |
|   | Zaburzenia przylegania leukocytów                              |
| Niedobory składników dopełniacza                          | Niedobory wczesnych składowych dopełniacza C1q, C1r, C2, C4    |
|   | Niedobory późnych składowych dopełniacza: C5–C9                |
|   | Niedobór C3  |

CVID (*common variable immunodeficiency*) — pospolity zmienny niedobór immunologiczny; SCID (*severe combined immunodeficiency*) — ciężki złożony niedobór odporności

limfocytów B uwarunkowana jest przez limfocyty T, toteż większość defektów w obrębie populacji limfocytów T powoduje złożone niedobory odporności.

W odpowiedzi wrodzoną zaangażowane są między innymi neutrofile, makrofagi, komórki dendrytyczne oraz białka układu dopełniacza. Ich zaburzenia jakościowe czy też ilościowe powodować mogą choroby objawiające się głównie niebezpiecznymi zakażeniami bakteryjnymi i grzybiczymi [2].

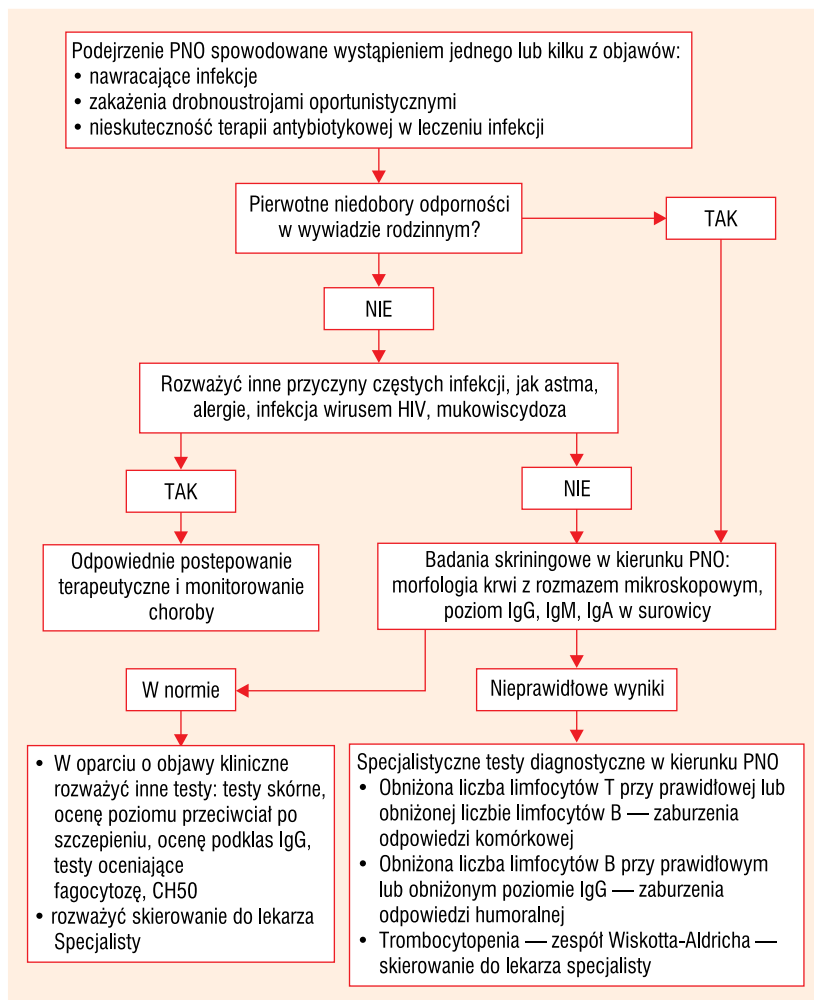
Pacjenci z PNO podatni są na nawracające zakażenia, z tendencją do przewlekania się i zaostrzeń. Szczegółowe zebranie wywiadu i badanie przedmiotowe to pierwsze kroki w rozpoznaniu choroby. Kolejnym obligatoryjnym etapem diagnostyki, pozwalającym na połączenie objawów klinicznych ze swoistym zaburzeniem odporności, są stopniowe, coraz bardziej szczegółowe badania laboratoryjne. W pierwszej kolejności powinny być przeprowadzane badania przesiewowe, a następnie badania specjalistyczne, które są dużo trudniej dostępne i kosztowne (ryc. 1) [3, 4].

Celem tego artykułu jest przedstawienie dostępnych badań laboratoryjnych przydatnych w diagnostyce pierwotnych niedoborów immunologicznych. Badania podzielono ze względu na ukierunkowanie na rozpoznanie określonych dysfunkcji układu odpornościowego, uwzględniając testy przesiewowe i specjalistyczne (tab. 2).

Zawarto także krótki opis badań mikrobiologicznych przydatnych przy ocenie powikłań infekcyjnych. Ze względu na bardzo dużą różnorodność dostępnych specjalistycznych testów diagnostycznych, skupiono się na tych najprzydatniejszych i najszerzej dostępnych.

### ZNACZENIE MORFOLOGII KRWI

Badaniem przeprowadzanym w pierwszej kolejności przy podejrzeniu PNO jest pełna morfologia krwi z mikroskopową oceną rozmazu. Prawidłowy wynik pozwala w większości przypadków na wykluczenie niedoborów immunologicznych, wynikających z zaburzeń



Rycina 1. Schemat postępowania przy podejrzeniu niedoboru odporności

liczności leukocytów obecnych we krwi obwodowej. Szczególną ostrożność należy zachować przy ocenie morfologii krwi noworodków. Przy wyraźnych objawach niedoboru odporności należy skierować dziecko na dalsze konsultacje [5].

Przesunięcia w liczbie poszczególnych rodzajów komórek krwi nasuwają podejrzenie danego rodzaju PNO. Limfopenia sugerować może PNO związane z dysfunkcją odpowiedzi komórkowej, neutropenia — upośledzenie komórek fagocytycznych. Istotna jest szczegółowa ocena preparatu mikroskopowego. Dla przykładu w zespole Wiskotta-Aldricha obserwujemy limfopenię z trombocytopenią i nieprawidłowym wyglądem płytek krwi. Inne zmiany morfologii krwi, takie jak eozynofilia

**”  
Pierwotne niedobory odporności mogą dotyczyć każdego elementu układu odpornościowego**

**Tabela 2**

**Podział testów stosowanych w diagnostyce pierwotnych niedoborów odpornościowych**

**Testy stosowane w diagnostyce pierwotnych niedoborów odporności**

|   | Testy skriningowe   | Testy specjalistyczne  |
|---|---|--|
| Testy oceniające odpowiedź humoralną              | Poziom przeciwciał IgG, IgM, IgA w surowicy<br>Miano specyficznych przeciwciał w surowicy | Miano podklas IgG<br>Miano swoistych przeciwciał po aktywnej immunizacji antygenowej<br>Miano izohemaglutynin<br>Ocena limfocytów B — cytometria przepływową<br>Produkcja przeciwciał in vitro w odpowiedzi na stymulację mitogenową, cytokinową lub anty-CD40 |
| Testy oceniające odpowiedź komórkową              | Liczba limfocytów<br>Badanie nadwrażliwości typu późnego — odczyn tuberkulinowy           | Ocena limfocytów T i NK — cytometria przepływową<br>Poziom ADA i PNP<br>Test transformacji blastycznej<br>Cytotoksyczność komórek NK<br>Ocena JAK3 i ZAP70 FISH — del 22q11, 10p11   |
| Testy oceniające fagocytozę                       | Ocena rozmazu krwi obwodowej  | Wytwarzanie rodników tlenowych — NBT<br>Ekspresja cząstek adhezyjnych — cytometria przepływową<br>Ocena chemotaksji<br>Ocena pochłaniania i fagocytozy   |
| Testy oceniające niedobory składników dopełniacza | Całkowita aktywność hemolityczna dopełniacza: CH50  | Alternatywna aktywność hemolityczna dopełniacza: AH50<br>Niedobór inhibitora C1 esterazy<br>Poziomy określonych składowych układu dopełniacza  |

CH50 (*total serum hemolytic complement assay*) — badanie całkowitej aktywności hemolitycznej dopełniacza; ADA — dezaminaza adenozyne; PNP — fosforylaza nukleozydów purynowych; JAK3 (*Janus kinase 3*) — kinaza tyrozynowa 3; ZAP70 (*zeta-chain associated protein kinase 70*) — niereceptorowa białkowa kinaza tyrozynowa; FISH (*fluorescent in situ hybridisation*) — fluorescencyjna hybrydyzacja in situ; NBT — błękit nitrotetrazolowy; AH50 (*alternative serum hemolytic assay*) — badanie alternatywnej aktywności hemolitycznej dopełniacza



**W diagnostyce PNO stosuje się testy skriningowe i specjalistyczne**

w zespole Omenna — forma ciężkiego złożonego niedoboru odporności (SCID, *severe combined immunodeficiency*) — czy obecność dużych ziarnistości w leukocytach w zespole Chediaka-Higashiego są kluczowe przy rozpoznaniu tych chorób [6, 7].

**OCENA ODPOWIEDZI HUMORALNEJ**

**■ Oznaczenie poziomów przeciwciał IgG, IgM, IgA**

Jest ono niezbędne w diagnostyce PNO. Poziomy immunoglobulin pozwalają na pośrednią ocenę kilku składowych układu immunologicznego, co związane jest z uwarunkowaniem produkcji przeciwciał ściśle współpracą limfocytów B, limfocytów T i komórek prezen-

tujących antygen. Wskazana jest ilościowa ocena immunoglobulin, co umożliwia między innymi metoda nefelometryczna. Metoda immunoelektroforetyczna dostarcza wyników półilościowych [8]. Nieprawidłowe miano przeciwciał wykazuje ponad 80% pacjentów z pierwotnymi niedoborami immunologicznymi [6]. Na niedobór przeciwciał wskazuje wynik całkowitego stężenia Ig < 400 mg/dl lub IgG < 200 mg/dl [5]. Przy obniżonych wartościach mian przeciwciał ważne jest, by uwzględnić możliwość ich utraty z organizmu przez przewód pokarmowy lub moczowy [9]. Należy zawsze interpretować wyniki w odniesieniu do norm dla danej grupy wiekowej. Poziom przeciwciał u noworodka nie odzwierciedla własnej

zdolności do produkcji, ponieważ utrzymują się u niego IgG przekazane przez łożysko.

Izolowany selektywny niedobór IgM jest bardzo rzadki. O czynności przeciwciał klasy IgM mówi **miano izohemaglutynin**, czyli przeciwciał klasy IgM występujących naturalnie w surowicy krwi człowieka, reagujących krzyżowo z antygenami grup krwi [4].

Izolowany niedobór IgA jest najczęstszym pierwotnym niedoborem immunologicznym i występuje z częstością 1/500 [5]. Inne zespoły są dużo rzadsze i szacuje się je na około 1/10 000 do 1/1000 000 osób [10].

Pod względem klinicznym PNO mogą bardzo przypominać wtórne upośledzenia odporności powstałe między innymi podczas niektórych infekcji wirusowych, na przykład HIV, po leczeniu immunosupresyjnym, terapii chorób autoimmunologicznych czy chemioterapii nowotworów.

Manifestacja choroby może być na tyle subtelna, że diagnostyka pozbawiona specjalistycznych badań immunologicznych może nie pozwolić na rozpoznanie. Jednocześnie wczesne wykrycie choroby i włączenie odpowiedniego leczenia zapobiega nieodwracalnym zmianom narządów i układów [2].

### ■ Oznaczenia podklas IgG

Oznaczenia te powinny być przeprowadzane wraz z oceną produkcji specyficznych przeciwciał. W kontakcie z antygenem białkowym zachodzi produkcja przeciwciał IgG1, natomiast po kontakcie z antygenem polisacharydowym wzrasta głównie poziom IgG2. Przy upośledzonej produkcji danej podklasy IgG wzrasta tendencja do zakażeń określonymi patogenami. Dla przykładu u chorych z niedoborem IgG2 obserwujemy częste zapalenia płuc wywołane bakteriami *Haemophilus influenzae*, które posiadają otoczkę polisacharydową. Badanie podklas IgG należy zawsze wykonać u osób z podejrzeniem izolowanego niedoboru IgA, ponieważ u chorych tych często obserwuje się także obniżenie poziomu IgG2. Przydatne jest ono także u pacjentów z niskim

całkowitym poziomem IgE, u których częste jest obniżenie poziomu IgG4 [11]. Istotność oceny podklas IgG jest jednak sporna. Badanie to ma ograniczoną wartość diagnostyczną i stosunkowo wysoki koszt wykonania [6, 9].

### ■ Miano specyficznych przeciwciał w surowicy

Pozwala ono na określenie wydolności odpowiedzi humoralnej. Testami szacującymi zdolność do odpowiedzi immunologicznej na antygeny białkowe są oznaczenia poziomów przeciwciał przeciwko anatoksynom tężca i błonicy po wcześniejszych szczepieniach Di-Te. Oznaczenia te wskazują na odpowiedź immunologiczną zależną od limfocytów T. Natomiast odpowiedź immunologiczną niezależną od limfocytów T szacujemy poprzez ocenę przeciwciał przeciwko bakteriom otoczkowym *Haemophilus influenzae* bądź *Streptococcus pneumoniae*. Przy ocenie miana specyficznych przeciwciał musi być uwzględniony wiek chorego oraz jego historia szczepień i przebytych chorób. Ze względu na brak szczegółowych, dopasowanych do wieku chorego norm poziomów specyficznych przeciwciał praktykuje się **ocenę wzrostu miana przeciwciał po szczepieniu przypominającym**. W tym celu należy pobrać krew przed szczepieniem przypominającym w celu wyjściowego oznaczenia miana danych przeciwciał, a następnie drugi raz po określonym dla danej szczepionki odstępie czasu. Najczęściej do laboratorium dostarcza się razem obie próbki w formie zamrożonych surowic [5]. Szczepionki polisacharydowe przeciwko pneumokokom stosuje się po 2 roku życia. Należy zauważyć, że brak odpowiedzi na szczepionkę nie zawsze jest jednoznaczny z niedoborem odporności. Dla przykładu u 5–15% pacjentów nie obserwuje się zmiany poziomu specyficznych przeciwciał po podaniu pełnej serii szczepień przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B. Może mieć to związek ze specyficznym haplotypem HLA, warunkującym osobniczą konfigurację immunogenetyczną [12]. HBV charakteryzuje



**Nieprawidłowe miano przeciwciał występują u ponad 80% pacjentów z PNO**

**Immunofenotypizacja  
jest bardzo przydatna  
w diagnostyce ciężkich  
złożonych niedoborów  
odporności (SCID)**

się także możliwością mutacji, zmieniających specyficzność antygeny Hbs i powodujących uniknięcie immunizacji. Dlatego nieprawidłowe miano specyficznych przeciwciał po szczepieniu należy sprawdzić przez szczepionkę alternatywną.

#### ■ Testy oceniające zdolność limfocytów B do produkcji przeciwciał po pobudzeniu mitogenowym

Jako mitogeny stosuje się wirus Epsteina-Barr (EBV), *Staphylococcus aureus* Cowan I, anty-IgM lub komórki gronkowca. Można stosować także stymulację cytokinową lub anty-CD40 [5].

#### ■ Ocena cytometryczna limfocytów B

Opiera się ona na zasadzie swoistego przyłączania znakowanych przeciwciał monoklonalnych do specyficznych receptorów na powierzchni komórek B.

Limfocyty B rozpoznawane są spośród innych limfocytów jako komórki posiadające antygeny powierzchniowe (CD, *cluster of differentiation*) CD19 i CD20. Prekursory limfocytów B, czyli komórki pre-B rozróżniane są w oparciu o detekcję ciężkich łańcuchów  $\mu$  w cytoplazmie limfocytów CD19+ [13, 14].

#### OCENA ODPOWIEDZI KOMÓRKOWEJ

##### ■ Testy skórne

Odporność typu komórkowego określana jest między innymi przy zastosowaniu **testów skórných**. Oceniają one reakcję nadwrażliwości typu późnego, zależną od limfocytów T. Testy te polegają na podaniu śródskórnym w obrębie wewnętrznej części przedramienia po 0,1 ml zawiesiny antygenów. Wynik jest prawidłowy, gdy średnica powstałej po 2 i 3 dniach zmiany przekracza 5 cm. Najszersze zastosowanie ma odczyn tuberkulinowy. W innych testach jako antygeny stosowane są: *Candida*, *Proteus*, *Trichophyton*, kompleks streptokinaza-streptodornaza czy paciorkowce [7]. Oceniając nadwrażliwość typu późnego, należy sprawdzić reakcję na kilka antygenów. Wynik

dodatni jest bardzo pomocny w postępowaniu diagnostycznym, natomiast należy ostrożnie podchodzić do wyników ujemnych. Ma to związek z faktem, że na osłabienie reakcji nadwrażliwości typu późnego wpływa wiele czynników, takich jak wiek, terapia sterydowa czy przebyte choroby [9].

##### ■ Cytometria przepływową

Ze względu na wysoką czułość, wiarygodność i powtarzalność wyparła ona oznaczenia histochemiczne. W ocenie subpopulacji limfocytów T stosuje się przeciwciała monoklonalne przeciwko antygenom powierzchniowym: CD2, CD3 — dla całkowitej liczby limfocytów T, CD4 — dla limfocytów Th, CD8 — dla limfocytów Tc. Przydatne może być wyznaczenie stosunku komórek CD4+/CD8+ [15]. Zmniejszona wartość tego indeksu może nasuwać podejrzenie wtórnego niedoboru odporności wywołanego infekcją HIV [4], obserwowana jest także w ciężkich postaciach pospolitego zmiennego niedoboru immunologicznego (CVID, *common variable immunodeficiency*) oraz idiopatycznej limfopenii komórek T CD4.

W diagnostyce PNO stosuje się także przeciwciała przeciwko CD45RA, CD62L (komórki T naiwne), CD45RO (komórki T pamięci), CD16, CD56 (komórki NK), CD40L [13, 14].

Określona ekspresja tych antygenów sugerować może dane jednostki chorobowe, jak na przykład obniżona ekspresja CD45RA na limfocytach T — CVID, przewaga limfocytów CD45RA+ przy braku limfocytów CD19+ — agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X [13]. Immunofenotypizacja jest bardzo przydatna w diagnostyce ciężkich złożonych niedoborów odporności (SCID, *severe combined immunodeficiency*). Dla przykładu podano poniżej kilka form SCID z charakterystycznym immunofenotypem.

— Th–Tc–B+NK– SCID — ciężki złożony niedobór odporności sprzężony z chromosomem X jest najczęściej występującą formą SCID, związaną z mutacją łańcucha  $\gamma$

(CD132). Łańcuch ten współtworzy receptory interleukinowe niezbędne dla prawidłowego różnicowania limfocytów T i B oraz komórek NK. W zespole tym obserwuje się całkowity brak limfocytów T i komórek NK oraz nieprawidłowy immunofenotyp limfocytów B (ekspresja na ich powierzchni IgM). Podobny immunofenotyp (T-B+NK-) występuje w SCID z mutacją kinazy tyrozynowej 3 (JAK3, *Janus kinase 3*)

- T-B+NK+ SCID — niedobór receptora  $\alpha$  IL-7 — w tej formie ciężkiego złożonego niedoboru odporności nie wykrywa się komórek CD3+, CD4+ CD8+ lub  $\gamma\delta$  TCR+ (T-cell receptor). Ekspresja IL-7 $\alpha$ R (CD127) jest obniżona lub nie obserwuje się jej.
- T-B-NK+ SCID — niedobór RAG1 i RAG2 (*recombination activating genes*) — brak lub obniżona liczba limfocytów T i B przy prawidłowej liczbie komórek NK. Nietypowy fenotyp jest efektem mutacji kilku genów odpowiedzialnych za tworzenie receptorów na komórkach B i T.
- T-B-NK- SCID — niedobór dezaminazy adenozyliny. Niedobór tego enzymu prowadzi do akumulacji w komórce toksycznych metabolitów hamujących syntezę DNA. U chorych występuje silna limfopenia < 500 komórek/ $\mu$ l.
- T+B+NK- SCID — ekspresja IL-2R I IL-15R $\beta$  wynosi poniżej 10% normy.
- T+B+ NK+ — brak cząsteczki MHC II, całkowita liczba limfocytów B i T jest w normie, populacja limfocytów T CD4+ silnie zmniejszona, obniżona jest także ekspresja CD45RA. Brak ekspresji białek MHC II na limfocytach B.
- złożony niedobór odporności z nadprodukcją IgM (*hyper IgM syndrome*) — jest rzadkim zespołem charakteryzującym się wysokim poziomem poliklonalnych IgM i IgD oraz obniżonym poziomem IgG, IgE oraz IgA. U tych chorych obserwuje się obniżoną ekspresję CD40L (CD154) na aktywowanych limfocytach [13, 14].

## OCENA FAGOCYTOZY

### ■ Cytometria przepływowa

Metodą cytometrii przepływowej można zbadać ilość receptorów CD11b i CD18 na powierzchni leukocytów. Ich obniżenie świadczy o **zmniejszeniu adhezji leukocytów**. Prawidłowa ekspresja tych receptorów warunkuje adhezję granulocytów do śródbłonnków i migrację przez ścianę naczynia do ogniska zapalnego, co jest wstępem do procesu fagocytozy. Brak cząsteczek adhezyjnych występuje w zespole zaburzonego przylegania leukocytów (LAD-1, *leukocyte adhesion deficiency-1*) [17].

### ■ Testy z wykorzystaniem gradientu czynnika chemotaktycznego

Testy te określają **chemotaksje leukocytów**. Mierzy się spontaniczną migrację niespolaryzowanych leukocytów na żelu agarozowym w kierunku czynnika chemotaktycznego (fMLP — formilo-metionilo-leucylo-fenylalanina, C5a — składowa dopełniacza, cytokina — IL-8) [7]. Także w tym przypadku analiza cytometryczna wypiera tradycyjne metody. Test cytometryczny, tak zwany Migra-Test, określa procent komórek zdolnych do przeprowadzenia efektywnej migracji w gradiencie czynnika chemotaktycznego.

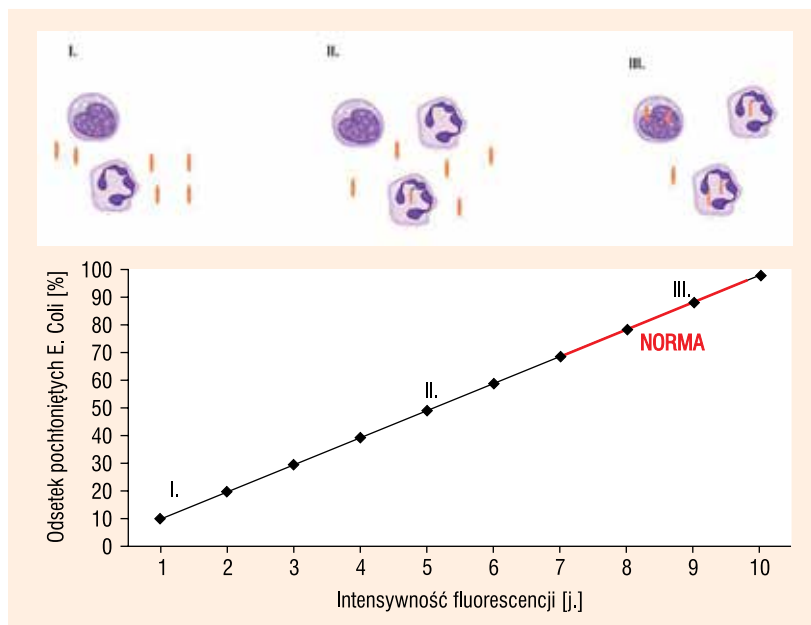
### ■ Ocena fagocytozy

**Fagocytozę**, czyli zdolności neutrofilów do pochłaniania bakterii, ocenia się tradycyjnie na podstawie średniej liczby cząstek sfagocytowanych przez jeden leukocyt w warunkach *in vitro*. Po sporządzeniu zawiesiny granulocytarnej i znakowanych bakterii, drożdży czy lateksu metodą mikroskopową odczytuje się pochłonięte cząsteczki w 50 lub 100 fagocytach [7].

Obecnie coraz częściej bada się zdolność komórek do fagocytozy przy pomocy testu cytometrycznego PhagoTest. Badanie to określa zdolność komórek do przeprowadzenia fagocytozy opsonizowanych bakterii *Escherichia coli*, znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym. Wynik stanowi odsetek granulocytów



**W diagnostyce PNO dotyczących komórek fagocytujących bardzo ważną rolę odgrywają testy czynnościowe**



**Rysunek 2.** Zasada działania testu cytometrycznego do oceny zjawiska fagocytozy; I. Próba kontrolna, fagocytoza zatrzymana poprzez inkubację w temperaturze 0°C, bardzo niska intensywność emitowanej fluorescencji; II, III — próby badane, inkubacja w 37°C, (II) pomiar u pacjenta z dysfunkcją procesu fagocytozy, zarejestrowano obniżony poziom fluorescencji, (III) pomiar u pacjenta zdrowego, emisja fluorescencji w zakresie normy (70–99% — w zależności od użytego zestawu normy różnią się)

**Niedobory dopełniacza mogą dotyczyć elementów drogi klasycznej, alternatywnej i lektynowej aktywacji dopełniacza**

i monocytów pełnej krwi heparynizowanej, zdolnej do aktywnej fagocytozy [rys. 2].

#### ■ Ocena zdolności neutrofilów do wytwarzania rodników tlenowych

Zdolność zabijania sfagocytowanych bakterii oceniana jest poprzez ocenę zdolności neutrofilów do wytwarzania rodników tlenowych. Tradycyjnie służył do tego test z błękitem nitrotertrazolowym (NBT) lub z cytochromem c. Test polega na spektrofotometrycznym pomiarze zmiany absorpcji światła spowodowanej redukcją barwnika przez uwalniane rodniki tlenowe. Test przydatny jest szczególnie w diagnostyce przewlekłej choroby ziarniniakowej i zespole Chediaka-Higashiego. U osób dotkniętych tymi jednostkami chorobowymi produkcja nadtlenków jest znacznie upośledzona, w efekcie czego nie powstaje produkt reakcji redukcji barwnika [5].

Obecnie test czynnościowy oceniający wybuch tlenowy wykonywany jako analiza

cytometryczna, tak zwany BurstTest, w dużej mierze wyparł testy z NBT [4]. Wyniki cytofluorometrii określają procent granulocytów zdolnych do produkcji rodników tlenowych po stymulacji (*Escherichia coli*, fMLP — formylo-metionylo-leucylo-feniloalanina, PMA — octan mirystynianu forbolu).

#### ■ OCENA UKŁADU DOPEŁNIACZA

Dopełniacz stanowi układ kilkudziesięciu białek spełniających istotną rolę głównie w nieswoistej humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Jego główne funkcje to między innymi udział w opsonizacji i usuwaniu patogenów oraz aktywacja reakcji zapalnej.

Niedobory dopełniacza dotyczyć mogą każdego elementu tego układu: drogi klasycznej (C1, C2, C4), alternatywnej (C3) czy lektynowej. Możliwy jest także defekt regulatora dopełniacza — inhibitora C1 esterazy [10].

#### ■ Badanie całkowitej aktywności hemolitycznej dopełniacza (CH50, total serum hemolytic complement assay)

Pozwala ono na detekcję większości przypadków PNO związanych z niedoborami dopełniacza. Badanie polega na inkubacji opłaszczonych przeciwciałami krwinek baranich z surowicą pacjenta i spektrofotometrycznym pomiarze ich rozpadu. Dodana do testu objętość surowicy powinna spowodować lizę około 50% krwinek zwierzęcych (stąd CH50). Nieprawidłowy wynik należy zweryfikować dokładniejszymi specjalistycznymi testami oceniającymi każdą ze składowych dopełniacza [5].

#### ■ Oceny poszczególnych składników

Metodami oceny poszczególnych składników są nefelometria, turbidymetria bądź test immunoenzymatyczny (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) [7]. Obniżone poziomy C3 i C4 wskazują na stałe zużycie dopełniacza, co charakterystyczne jest w przypadku powstawania kompleksów immunologicznych [4].



### Badanie alternatywnej aktywności hemolitycznej dopełniacza (AH50, *alternative serum hemolytic assay*)

Niedobory składowych alternatywnej drogi aktywacji dopełniacza są niezmiernie rzadkie [6]. Do ich oceny wykorzystuje się badanie alternatywnej aktywności hemolitycznej dopełniacza (AH50, *alternative serum hemolytic assay*). Test ten wykorzystuje technikę immunodifuzji radialnej. Surowicę pacjenta nakłada się na żel agarozowy zawierający kurze krwinki czerwone. Następuje aktywacja alternatywnej drogi dopełniacza, której aktywność jest proporcjonalna do obszaru zli-zowanych krwinek [16].

Słumienie obu indeksów CH50 i AH50 wskazuje na defekty końcowych składowych dopełniacza (C5, C6, C7, C8), tworzących zespół atakujący błonę komórki [4].

### DIAGNOSTYKA POWIKŁAŃ INFEKCYJNYCH W PNO

Istota diagnostyki mikrobiologicznej wynika nie tylko z konieczności zapobiegania i leczenia powikłań infekcyjnych, ale może dostarczyć także informacji o rodzaju niedoboru odporności.

Zaburzenia określonego elementu układu immunologicznego zwiększają podatność na określone patogeny (tab. 3).

Zakażenia u chorych z PNO mają charakter przewlekły i często nawracający. Najczęściej dotyczą układu oddechowego, rzadziej układu pokarmowego i skóry. U takich chorych możliwe są zakażenia nie tylko drobnoustrojami patogennymi, ale także oportunistycznymi, między innymi *Cryptosporidium*, *Candida*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium* czy wirusem cytomegalii.

W diagnostyce mikrobiologicznej pacjentów z PNO istnieje wiele problematycznych kwestii. Ze względu na źle dobrany materiał do badań czy na włączenie antybiotykoterapii u chorych posiewy mikrobiologiczne często dają wyniki ujemne. Podobnie badania serologiczne mogą dawać wyniki fałszywie ujemne. Ma to związek z zaburzeniami odpowiedzi hu-

**Tabela 3**

**Najczęstsze rodzaje zakażeń w poszczególnych grupach pierwotnych niedoborów immunologicznych [17]**

| Typ zaburzenia odporności                                       | Typowe patogeny   |
|---|---|
| Zaburzenia odporności humoralnej                                | <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Giardia intestinalis</i> , <i>Mycoplasma</i> , enterowirusy         |
| Zaburzenia odporności komórkowej i złożone niedobory odporności | <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , prątki gruźlicy, <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cryptosporidium</i> , HSV, CMV, EBV, RSV, adenowirusy |
| Zaburzenia fagocytozy   | <i>Staphylococcus aureus</i> , jelitowe pałeczki G(-), <i>Serratia marcescens</i> , <i>Mycobacterium bovis</i> , <i>Aspergillus</i>   |
| Zaburzenia układu dopełniacza                                   | <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria</i>  |

HSV (*Herpes simplex virus*) — wirus opryszczki pospolitej; CMV (*Cytomegalovirus*) — wirus cytomegalii; EBV — wirus Epsteina-Barr; RSV — *respiratory syncytial virus*

moralnej. Dla przykładu u pacjenta ze złożonym niedoborem odporności wyniki IgG, IgM mogą być ujemne mimo zakażenia wirusem. Lekarz powinien przy interpretacji wyników uwzględnić także terapię dożylną czy podskórną immunoglobulinami.

Popełniane błędy mogą być dla chorych bardzo poważne w skutkach. Należy podkreślić znaczenie techniki reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) w diagnostyce infekcji u chorych z PNO [17].

### ZNACZENIE BADAŃ GENETYCZNYCH

Pierwotne niedobory odporności są chorobami o podłożu genetycznym. Mają różny charakter, mogą być sprzężone z chromosomem X bądź są autosomalne dominujące lub recesywne.

Obecnie szybko rozwijającą się gałęzią diagnostyki jest immunogenetyka. Znany szereg metod, takich jak fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH, *fluorescent in situ hybridization*), hybrydyzacja metodą Southerna (SB, *Southern blotting*), hybrydyzacja northern (NB, *northern blotting*), rekombinowanie i klonowanie DNA, przydatnych w ustaleniu czynnika odpowiadającego za chorobę [10]. Analiza molekularna nie pozwala jednak na jasne przyporządkowanie wadliwego genu do określonej jednostki chorobowej. Ma to związek z tym, że mutacja tych samych genów może powodować różne objawy kliniczne.



**Zaburzenia określonego elementu układu immunologicznego zwiększają podatność na określone patogeny. Zakażenia w PNO mają charakter przewlekły i często nawracający**

Pierwotny niedobór odporności był pierwszą chorobą wrodzoną, w której zastosowano terapię genową. Zanotowano sukces w terapii genowej SCID z niedoborem deaminazy adenozynowej oraz w kilku innych zespołach. Dalsze badania są obiecujące. Dodatkowo badania genetyczne mają znaczenie w diagnostyce prenatalnej.

### ZAKOŃCZENIE

Prawidłowa i szybka diagnoza pacjentów z PNO pozwala na wprowadzanie skutecznej terapii i zapobieganie niebezpiecznym powi-

kłaniom. Niestety wciąż duża część pacjentów zostaje zdiagnozowana zbyt późno mimo częstych hospitalizacji, spowodowanych typowymi dla PNO infekcjami. Szybki rozwój nowoczesnych technik diagnostyki laboratoryjnej wymaga od lekarza ciągłej aktualizacji wiedzy w tej dziedzinie. Lekarz pierwszego kontaktu powinien skierować pacjenta z charakterystycznymi symptomami na konsultacje specjalistyczne. Dalsza szczegółowa diagnoza, obejmująca opisane w niniejszym artykule badania laboratoryjne, pozwoli na trafne postawienie diagnozy.

### PIŚMIENNICTWO

1. Capel H. Classification of primary immunodeficiency diseases by the international Union of Immunological Societies (IUIS) Expert Committee on Primary Immunodeficiency 2011. *Clinical and Experimental Immunology* 2011; 168: 58–59.
2. McCusker Ch., Warrington R. Primary immunodeficiency. *Allergy Asthma & Clinical Immunology* 2011; 7 (1): 1–11.
3. Cooper M., Pommering T., Koranyi K. Primary Immunodeficiencies. *Am. Fam. Physician* 2003; 68 (10): 2002–2008.
4. Chinratanapisit S., Sriaroon P., Sleasman J. W., Good R. A. Diagnostyka osoby dorosłej z podejrzeniem niedoboru odporności. *Witryna Word Allergy Organization*, 2008.
5. Dizon J.G., Goldberg B.J., Kaplan M.S. Diagnostyka niedoborów odporności. *Medycyna praktyczna — pediatria* 2000; 4: 98–109.
6. Lederman H.M. The clinical presentation of primary immunodeficiency diseases. *Clinical Focus on Primary Deficiencies*, 2000; 2 (1).
7. Dembińska-Kieć A., Naskalski J.W. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. *Wrocław* 2010: 851–859.
8. Ballou M. Primary immunodeficiency disorders: Antibody deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 109 (4): 581–591.
9. Primary immunodeficiency diseases — raport of an IUIS Scientific Committee. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 118 (1): 1–28.
10. Zeman K., Szałowska D. Pierwotne niedobory odporności — ważna grupa rzadkich chorób uwarunkowanych genetycznie. *Przegląd pediatryczny* 2006; 36 (4): 251–257.
11. Vries E., Patient-centred screening for primary immunodeficiency: a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists. *Clinical and Experimental Immunology* 2006; 145: 204–214.
12. Fried A.J., Bonnilla L., Pathogenesis, diagnosis and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clinical Microbiology Reviews* 2009; 22 (3): 396–414.
13. Illoh Orijeji C. Current application of flow cytometry in diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2004; 128: 23–31.
14. O’gorman M. Role of flow cytometry in the diagnosis and monitoring of primary immunodeficiency diseases. *Clin. Lab. Med.* 2007; 27: 591–626.
15. Kopeć-Szłęczak J. Subpopulacje limfocytów T. *Onkol. Pol.* 2005; 8 (1): 17–20.
16. Bonnilla F.A., Bernstein L., Khan D. A i wsp. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. 2005: 94.
17. Wolska-Kuśnierz B., Kurenko-Deptuch M., Bernatowska E. Trudności w rozpoznawaniu i leczeniu powikłań infekcyjnych u chorych z pierwotnymi niedoborami odporności. *Przeg. Epidemiol.* 2008; 62: 123–131.