



INSTYTUT „POMNIK-CENTRUM ZDROWIA DZIECKA”

PRZEWODNIK PO BADANIACH

Pracownia Zgodności Tkankowej

Opracowanie: dr hab. n. med. Barbara Piątosa we współpracy z
zespołem Pracowni Zgodności Tkankowej IPCZD

wydanie I (2024)

04-730 Warszawa, Al. Dzieci Polskich 20

Tel/fax. 22-815-19-35, 22 815-77-49

e-mail: zgodnosc.tkankowa@ipczd.pl

Kierownik: dr hab. n med. Barbara Piątosa, prof. Instytutu

Tel. 22-815-19-32

e-mail. b.piatosa@ipczd.pl

SPIS TREŚCI

Wstęp	1
Informacje ogólne	1
Materiał do badań	1
Surowica	2
Krew pełna.....	2
Fragmenty tkankowe.....	2
Zlecenie badań laboratoryjnych	2
Informator szczegółowy	4
Badania antygenów HLA metodami biologii molekularnej w zakresie antygenów HLA A,B,C,DR,DQ, DP	4
Antygen HLA-B27.....	5
Genotyp DQ2/DQ8	5
Immunologia transplantacyjna.....	6
Przeciwciała limfocytotoksyczne zależne od dopełniacza (PRA)	6
Przeciwciała anti-HLA	7
Ocena obecności przeciwciał anti-HLA wiążących składową C1q dopełniacza	8
Próba krzyżowa - przeszczep od dawcy zmarłego.....	9
Próba krzyżowa - dawca rodzinny	11
Próba krzyżowa (cross-match) oceniana metodą cytometrii przepływowej (FCXM)	12
Diagnostyka zaburzeń odporności z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.....	13
Panel Mini (Limfocyty T, B, NK)	13
Panel podstawowy (T, B, NK, T pom., T supr., CD4:CD8)	14
Limfocyty T dziewicze/pamięci.....	15
Dojrzewanie limfocytów T	16
Rozszerzona ocena dojrzewania limfocytów T.....	17
Receptor TCR.....	18
Klonalność łańcucha V β receptora TCR.....	19
Wspólny łańcuch γ receptorów dla IL (CD132)	20
Łańcuch α receptora dla IL7 (IL7R α , CD127)	21
Markery aktywacji limfocyta T	22
Efektorowe limfocyty T (TH1/ TH2/ TH9/ TH17/ TH17.1 /TH22 /THG/TFH1 /TFH2 /TFH17/TFH17.1)	23
MAIT	24
FOXP3	25
TFH/TFR	26
Panel CVID (Dojrzewanie limfocytów B na obwodzie)	27
CVID rozszerzony (Dojrzewanie limfocytów B na obwodzie).....	28

Szpik – dojrzewanie linii komórkowych	29
Szpik – panel chłoniakowy.....	31
Łańcuchy lekkie kappa/lambda	33
Btk.....	34
BAFF-R (TNFRSF13C, CD268)	34
TACI (TNFRSF13B, CD267)	35
ICOS (CD278)	36
Cząsteczki adhezyjne (integryny β 2)	37
MHC klasa I	38
MHC klasa II	39
Receptor dla interferonu γ (IFN γ R1)	40
Receptor dla Interleukiny 12 (IL12R β 1).....	41
Receptor dla IL-2	42
Limfocyty T podwójnie ujemne – DNT	42
CD95 (=FAS).....	43
Ligand dla CD95 (CD95L=CD178).....	44
CD57	45
iNKT	46
CD40	47
Ligand dla CD40 (CD40L=CD154).....	47
PTLD.....	48
Węzeł chłonny – ocena rozrostu	50
Mieloperoksydaza (MPO).....	51
Wybuch tlenowy.....	52
Perforyna.....	53

Wstęp

Pracownia Zgodności Tkankowej Instytutu „Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka” powstała w 1979 roku. Wpisana jest do Ewidencji Laboratoriów prowadzonej przez Krajową Radę Diagnostów Laboratoryjnych pod numerem identyfikacyjnym 2805.

W Pracowni wykonywane są badania w zakresie immunologii transplantacyjnej oraz diagnostyki wrodzonych błędów odporności. Badania w zakresie immunologii transplantacyjnej wykonywane są na mocy pozwolenia Ministra Zdrowia.

Wykorzystanie wyników badań zlecanych do celów diagnostycznych do opracowań naukowych jest dopuszczalne wyłącznie za zgodą Kierownika Pracowni.

Adres:

Pracownia Zgodności Tkankowej

Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”

04-730 Warszawa, Al. Dzieci Polskich 20

Tel/fax. 22-815-19-35, 22 815-77-49

e-mail: zgodnosc.tkankowa@ipczd.pl

Kierownik: dr hab. n med. Barbara Piątoś, prof. Instytutu

Tel. 22-815-19-32

e-mail. b.piatosa@ipczd.pl

Informacje ogólne

Informator zawiera krótkie opisy wszystkich badań wykonywanych w Pracowni Zgodności Tkankowej z uwzględnieniem:

- celu badania
- pełnej nazwy badania
- metody laboratoryjnej zastosowanej w analizie
- ilości i rodzaju materiału biologicznego
- zasady badania i sposobu formułowania wyniku
- znaczenia diagnostycznego
- ograniczeń metody

Wartości referencyjne dla poszczególnych parametrów podawane są na wynikach.

Badania pogrupowane są w zestawy powiązane z kosztami.

W osobnych rozdziałach przedstawiono opis sposobów pobierania materiału biologicznego oraz zasady zlecenia badań.

Materiał do badań

Materiał biologiczny do badań zależy od rodzaju zleconego badania. Próbkę do badań należy dostarczać niezwłocznie po pobraniu, nie później niż w ciągu 24 godzin od pobrania i transportować w warunkach temperatury otoczenia (16-25°C). W przypadku niemożliwości dostarczenia próbek do badań niezwłocznie po pobraniu należy je zabezpieczyć i transportować w sposób wskazany przy poszczególnych badaniach.

Próbki należy opisać imieniem i nazwiskiem, nr PESEL pacjenta oraz datą/godziną pobrania.

Pojemnik z węzłami chłonnymi/fragmentami śledzony dawcy zmarłego należy dodatkowo opisać grupą krwi dawcy, po uprzednim jej zweryfikowaniu w dokumentacji pacjenta.

Surowica

Krew żylną „na skrzep” należy pobrać do strzykawki lub do probówki z aktywatorem wykrzepiania w systemie zamkniętym (próżniowym) w ilości 3-5 ml.

Materiał należy dostarczyć do laboratorium w dniu pobrania materiału.

W przypadku, gdy niemożliwe jest dostarczenie próbki we wskazanym czasie, krew po pobraniu należy pozostawić w temperaturze pokojowej do wytworzenia i retrakcji skrzepu, następnie odwirować. Surowicę przenieść do innej probówki. W przypadku hemolizy lub obecności innych zanieczyszczeń próbkę należy ponownie odwirować lub ponownie pobrać materiał.

Przechowywanie materiału /transport: pełna krew 2-8 °C (temp. lodówki), próbki zamrożone - w pojemnikach zapewniających pozostanie w stanie zamrożenia.

Krew pełna

Rodzaj antykoagulantu oraz minimalna ilość materiału niezbędnego do badań zależy od rodzaju badania:

- Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA) - ocena ekspresji molekuł powierzchniowych, nie wymagająca stymulacji. W przypadku łączenia większej liczby paneli – minimalną objętość próbki należy skonsultować z Pracownią (zazwyczaj wymagana objętość nie przekracza 2,7 ml)
- Krew obwodowa – 2,7 ml (heparyna sodowa) - ocena ekspresji molekuł wymagających aktywacji
- Krew obwodowa – 2,7 ml (EDTA) - badania antygenów zgodności tkankowej

Uwagi:

1. We wszystkich badaniach, w których pobranie krwi wymaga stosowania EDTA jako antykoagulantu może być to K2 EDTA lub K3 EDTA.
2. W przypadku stosowania u pacjentów leków mających wpływ na wynik badania próbki należy pobrać przed podaniem leku. W razie wątpliwości prosimy o kontakt z Pracownią.

Fragmenty tkankowe

- węzły chłonne lub fragment śledzony - pojemnik z solą fizjologiczną przekazany niezwłocznie po pobraniu.

Zlecenie badań laboratoryjnych

Warunkiem przyjęcia badania do laboratorium jest czytelne i dokładne wypełnienie formularza odpowiedniego zlecenia opracowanego w Pracowni Zgodności Tkankowej, dostępnego na stronie www.czd.pl, zgodnie ze ścieżką dostępu <https://www.czd.pl/strony/dzialalnosc-kliniczna/pracownie/pracownia-zgodnosci-tkankowej>

Należy zwrócić uwagę na dokładne wpisanie następujących danych:

- a. Nazwisko i imię, data urodzenia, płeć, PESEL pacjenta. W przypadku zleceń na próbę krzyżową, należy dodatkowo umieścić na zleceniu informację o grupie krwi dawcy /biorcy narządu i opatrzyć tę informację podpisem i pieczęcią lekarza.
- b. Pełna nazwa instytucji zlecającej – płatnika (pieczętka) / ośrodek kosztów
- c. Dane kliniczne pacjenta,
- d. Nazwisko i imię osoby pobierającej materiał do badań

- e. Data i godzina pobrania materiału biologicznego
- f. Nazwisko i imię lekarza kierującego na badania wraz z pieczętą i podpisem
- g. Zobowiązanie do pokrycia kosztów (dotyczy płatników zewnętrznych) – o ile wcześniej nie została zawarta umowa na wykonywanie badań w PZT.

Zlecenie wybranego badania polega na zaznaczeniu go krzyżykiem w wolnej kratce obok nazwy badania wskazanej na skierowaniu.

Badania dla kontrahentów zewnętrznych, którzy nie mają podpisanej umowy z IPCZD, wykonywane są wyłącznie na podstawie zleceń z gwarancją płatności w postaci podpisu Dyrektora Instytucji i/lub Głównego Księgowego kontrahenta, względnie potwierdzenia dokonania płatności w kasie IPCZD.

UWAGI

1. Niektóre badania wymagające stymulacji komórek nie są wykonywane w ostatni roboczy dzień tygodnia. Informacja na ten temat zawarta jest w tym informatorze przy opisie takiego badania.
2. Niektóre badania wymagają pobrania próbki kontrolnej pobranej od osoby zdrowej. W szczególnych przypadkach nie może być to próbka pobrana od członka rodziny. Informacja na ten temat zawarta jest w tym informatorze przy opisie takiego badania.
3. Niektóre rodzaje badań wykonywane są wyłącznie w seriach wymagających zgromadzenia większej liczby próbek. Informacja na ten temat zawarta jest w tym informatorze przy opisie takiego badania.
4. W przypadku konieczności stosowania leków mogących wpływać na wynik badania próbkę należy pobrać przed podaniem leku.

Informator szczegółowy

Badania antygenów HLA metodami biologii molekularnej w zakresie antygenów HLA A,B,C,DR,DQ, DP

Cel

Dobór dawcy i biorcy do przeszczepów narządów unaczynionych lub komórek macierzystych.

Metoda

Oparta o reakcję łańcuchowej polimerazy z zastosowaniem sond specyficznych dla poszczególnych alleli (PCR-SSP lub PCR-SSO)

Materiał do badania

Krew obwodowa – 2,7 ml (EDTA)

Sposób oceny

Identyfikacja swoistych produktów amplifikacji

Sposób formułowania wyniku

Określenie genotypu dla badanych alleli

Ograniczenia

- Badania są wykonywane w seriach.
- Badania w trybie cito wykonywane są wyłącznie dla zmarłych dawców narządów, na potrzeby transplantacji narządów unaczynionych.

Uwagi

1. Należy wybrać odpowiedni zestaw antygenów do badania (do wyboru):

- HLA- A,B,DR
- HLA-A,B,DR,DQ
- HLA-A,B,C,DR
- HLA- A,B,C,DR,DQ
- HLA- A,B,C,DR,DQ, DP

2. Badania dla członków rodzin, potencjalnych rodzinnych dawców komórek macierzystych dla wymagających przeszczepienia pacjentów IPCZD, są refundowane przez NFZ jako świadczenie odrębnie kontraktowane w zakresie HLA-A, B, DR. Pozostałe loci oznaczane są na koszt zleciodawcy.

Badania dla pacjentów zgłoszonych do przeszczepienia narządów unaczynionych do Ustawowych Rejestrów Transplantacyjnych są finansowane przez Poltransplant w ramach odpowiedniego kontraktu:

- Zgłoszeni do przeszczepienia nerki, dla pacjentów <18 roku życia – w zakresie HLA-A, B, Cw, DR, DQ, DPw
 - Zgłoszeni do przeszczepienia wątroby, dla pacjentów <18 roku życia – w zakresie HLA-A, B, DR
3. Dla płatników prywatnych badania wykonywane są wyłącznie na podstawie zlecenia lekarza na druku zlecenia Pracowni Zdugności Tkankowej dostępnego na stronie IPCZD.

Antygen HLA-B27

Cel

Badanie wykonywane pomocnicze w diagnostyce spondyloartropatii i zapalenia błony naczyniowej oka.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Sposób oceny

Identyfikacja komórek przejawiających ekspresję HLA B27

Sposób formułowania wyniku

Wykazano/nie wykazano ekspresji antygenu HLA B27

Ograniczenia

Wykazanie ekspresji antygenu HLA-B27 nie jest tożsame z rozpoznaniem podejrzanej jednostki chorobowej.

Uwagi

W przypadkach wątpliwych badanie wykonywane jest metodami biologii molekularnej z tej samej próbki.

Genotyp DQ2/DQ8

Cel

Badanie wykonywane pomocniczo w diagnostyce celiakii.

Metoda

Oparta o reakcję łańcuchowej polimerazy z zastosowaniem sond specyficznych dla poszczególnych alleli (PCR-SSO, PCR-SSP)

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Sposób oceny

Identyfikacja swoistych produktów amplifikacji

Sposób formułowania wyniku

- antygen HLA DQ2 wykazano/nie wykazano
- antygen HLA DQ8 wykazano/nie wykazano

Ograniczenia metody

Wynik badania nie potwierdza ani nie wyklucza rozpoznania celiakii. Wg ekspertów ok. 3% chorych na celiakię nie przejawia ekspresji antygenów HLA-DQ2 i/lub HLA-DQ8, a ok. 2% pacjentów spełnia pozostałe kryteria rozpoznania celiakii i przejawia ekspresję innych antygenów HLA-DQ.

Uwagi

Badania wykonywane są w seriach. Nie ma możliwości zlecenia badania w trybie cito.

Immunologia transplantacyjna

Przeciwciała limfocytotoksyczne zależne od dopełniacza (PRA)

Cel

Ocena stanu immunizacji powstającej w wyniku przetoczeń krwi, przeszczepień, ciąży - poprzez ocenę obecności przeciwciał zależnych od dopełniacza. Badanie wykonywane jest u pacjentów oczekujących na przeszczepienie narządów unaczynionych.

Metoda

Test limfocytotoksyczny zależny od dopełniacza

Materiał do badania

2 ml surowicy lub 5 ml krwi obwodowej pobranej na skrzep

Sposób oceny

Ocena reaktywności badanej surowicy z panelem limfocytów pobranych od 30 przypadkowych dawców krwi.

Sposób formułowania wyniku

Procent panelu zawieszin limfocytów pochodzących od przypadkowych 30 dawców, z którym w surowicy wykazano obecność przeciwciał wiążących się z antygenami na powierzchni limfocytów badanych dawców, zdolnych do wiązania dopełniacza (tzw. przeciwciał limfocytotoksycznych).

Ograniczenia metody

Badanie nie pozwala na określenie swoistości wykrytych przeciwciał.

Uwagi

1. Wykazanie obecności przeciwciał limfocytotoksycznych wskazuje na immunizację antygenami HLA innymi niż własne pacjenta. Może być skutkiem przetoczeń krwi, wcześniejszej transplantacji lub ciąży. W rzadkich przypadkach możliwe jest powstanie przeciwciał krzyżowo-reaktywnych po niektórych infekcjach.
2. Możliwe jest rozróżnienie klasy przeciwciał IgG od IgM za pomocą badania wykonanego równolegle w tej samej surowicy w stanie natywnym i po rozszczepieniu wiązań dwusiarczkowych w IgM za pomocą DTT.
3. Na wynik badania ma wpływ szereg czynników:
 - a. Aktywność dopełniacza endogennego w surowicach badanych.
 - b. Obecność autoprzeciwciał i/lub przeciwciał krzyżowo-reagujących z antygenami HLA.

- c. Obecność w surowicy kompleksów immunologicznych, krioglobulin, skrzeplin, czynników chelatujących jony wapnia, np. EDTA
 - d. Uszkodzenie błony komórkowej wykorzystanych w badaniu limfocytów na drodze innych mechanizmów niż reakcja antygen-przeciwciało-dopełniacz, np. obecność czynników toksycznych, zanieczyszczenie mikrobiologiczne, pH środowiska badania wykraczające poza zakres fizjologiczny.
4. Badanie wykonywane wyłącznie w seriach, każdorazowo na początku miesiąca kalendarzowego. Nie ma możliwości zlecenia badania w trybie cito

Przeciwciała anty-HLA

Cel

Identyfikacja obecności przeciwciał anty-HLA w klasie IgG.

Metoda

Test fazy stałej z wykorzystaniem mikrokulek opłaszczonych swoistymi antygenami HLA (tzw. technika multipleksów (lub bead array)).

Materiał do badania

2 ml surowicy lub 5 ml krwi pełnej pobranej na skrzep

Sposób oceny

Stwierdzenie obecności/braku obecności przeciwciał anty-HLA

Sposób formułowania wyniku

- a) Badanie przesiewowe:
 - negatywny
 - pozytywny
- b) Badanie swoistości przeciwciał anty-HLA
 - wykryto przeciwciała anty-HLA w klasie IgG o wskazanej na wyniku swoistości (z uwzględnieniem mediany fluorescencji (MFI))

Ograniczenia metody

1. Wykrywane przeciwciała należą do klasy IgG.
2. Wartość MFI nie określa miana/stężenia przeciwciał.
3. Ewentualne narastanie lub spadek miana przeciwciał można podejrzewać przy zmianie wartości wykazanej fluorescencji (MFI) o co najmniej 25% w kolejnych okresach obserwacji.
4. Przetoczenie preparatów immunoglobulin, leczenie ATG, przeciwciałem monoklonalnym anty-CD20 może skutkować uzyskaniem wyniku fałszywie dodatniego.
5. Niektórzy pacjenci wykazują obecność przeciwciał anty-HLA tzw. naturalnych, powstałych bez znanej immunizacji – nie jest znane znaczenie kliniczne tych przeciwciał.
6. Obecność przeciwciał anty-HLA klasy IgM może być przyczyną reakcji fałszywie negatywnych.

Uwagi

1. Badanie wykonywane wyłącznie w seriach, zazwyczaj 1x w tygodniu.

- Wybór **anty-HLA/MICA screen** oznacza wykonania badania przesiewowego w kierunku obecności przeciwciał klasy IgG skierowanych przeciwko antygenom HLA i/lub MICA oraz ocenę swoistości przeciwciał anty-HLA wykrytych w badaniu przesiewowym.
- Wybór wyłącznie **ocena swoistości anty-HLA** oznacza wykonanie badania wyłącznie w kierunku oceny swoistości przeciwciał anty-HLA klasy I i II, z pominięciem badania przesiewowego
- Ocena swoistości przeciwciał w stosunku do dawcy narządu możliwa jest tylko wówczas, gdy znany jest genotyp dawcy i biorcy.
- Wykrycie immunizacji *de novo* po przeszczepieniu wymaga znajomości statusu immunizacji w dniu przeszczepienia. W przypadku braku wiedzy o stanie immunizacji w dniu przeszczepienia prosimy o kontakt z Pracownią w celu weryfikacji dostępności surowicy z dnia przeszczepu i ewentualnego zlecenia badania w dniu 0.

Ocena obecności przeciwciał anty-HLA wiążących składową C1q dopełniacza

Cel

Ocena zdolności wiązania składowej C1q dopełniacza przez obecne w surowicy badanej przeciwciała anty-HLA.

Metoda

Test fazy stałej z wykorzystaniem mikrokulek opłaszczonych swoistymi antygenami HLA (tzw. technika multipleksów (lub bead array)

Materiał do badania

2 ml surowicy lub 5 ml krwi pełnej pobranej na skrzep.

Sposób oceny

Stwierdzenie obecności/braku obecności przeciwciał anty-HLA wiążących składową C1q dopełniacza, tj. anty-HLA klasy IgG i IgM.

Sposób formułowania wyniku

Zależy od wyboru wariantu badania:

anty-HLA C1q screen - Badanie przesiewowe

— negatywny

— pozytywny

wskazuje odpowiednio na brak obecności przeciwciał zdolnych do wiązania dopełniacza (negatywny) lub obecność przeciwciał zdolnych do wiązania dopełniacza (pozytywny), nie przesądzając o klasie immunoglobulin wykrytych przeciwciał (IgG i/lub IgM).

ocena swoistości przeciwciał litycznych anty-HLA (C1q) - wykryta swoistość przeciwciał anty-HLA z medianą fluorescencji (MFI), bez możliwości wskazania klasy immunoglobulin wykrytych przeciwciał (IgG i/lub IgM).

Ograniczenia metody

- Badanie nie pozwala na rozróżnienie klasy immunoglobulin (IgG vs IgM), do której należą wykryte przeciwciała.
- Obecność hemoglobiny w badanej próbce istotnie podwyższa MFI wykrywanych przeciwciał.

Uwagi

1. Badania wykonywane są wyłącznie w seriach nie mniejszych niż 20 surowic.
2. Badania wykonywane są w surowicach, w których wcześniej wykazano obecność przeciwciał anty-HLA klasy IgG.
 - Na żądanie zleceniodawcy możliwe jest wykonanie badania w surowicach, w których nie badano lub nie stwierdzono obecności przeciwciał anty-HLA w klasie IgG.
3. Wybór **anty-HLA C1q screen** oznacza wykonanie badania przesiewowego w kierunku obecności przeciwciał klasy IgG/IgM skierowanych przeciwko antygenom HLA i/lub MICA zdolnych do wiązania składowej C1q dopełniacza oraz ocenę swoistości przeciwciał anty-HLA wykrytych w badaniu przesiewowym.
 - Zlecenie badania może być uzasadnione we wczesnym okresie procesu odrzucania.
 - i. Badanie wykonywane może być wyłącznie w seriach, zazwyczaj nie częściej niż 1 raz w miesiącu. Dlatego nie jest możliwe wykorzystanie wyników w bieżącym procesie diagnostycznym.
4. Wybór wyłącznie **ocena swoistości przeciwciał litycznych anty-HLA (C1q)** oznacza wykonanie badania wyłącznie w kierunku oceny swoistości przeciwciał anty-HLA klasy I i II zdolnych do wiązania składowej C1q dopełniacza, z pominięciem badania przesiewowego.

Próba krzyżowa - przeszczep od dawcy zmarłego

Cel

Wykrycie obecności w surowicy biorcy przeciwciał zdolnych do wiązania dopełniacza skierowanych przeciwko antygenom powierzchniowym limfocytów potencjalnego dawcy (allogeniczne) lub własnych (autologiczne), będących przyczyną nadostrego odrzucania oraz identyfikacja potencjalnych biorców przeszczepu, u których nie wykryto przeciwciał wiążących dopełniacz przeciwko antygenom obecnym na powierzchni limfocytów dawcy.

Metoda

Test mikrolimfocytotoksyczny zależny od dopełniacza.

Materiał do badania

Biorca:

— Surowica - aktualna (nie starsza niż pobrana 6 tygodni wcześniej) (z archiwum)

Dawca:

— węzły chłonne (min. 2) w soli fizjologicznej 0,9%NaCl i fragment śledziony w szczelnie zamkniętym i opisanym pojemniku, transportowane do pracowni w warunkach schłodzenia (4-8°C)

Sposób oceny

Ocena obecności w surowicy biorcy przeciwciał limfocytotoksycznych o swoistości odpowiadającej antygenom obecnym na powierzchni limfocytów potencjalnego dawcy polega na rozróżnieniu komórek żywych/martwych po przeprowadzeniu reakcji: antygen (na limfocytach potencjalnego dawcy)-przeciwciało (w surowicy potencjalnego biorcy przeszczepu)-dopełniacz.

Sposób formułowania wyniku

— Próba krzyżowa ujemna

- oznacza, że w badanej surowicy nie stwierdzono obecności przeciwciał limfocytotoksycznych wobec antygenów obecnych na powierzchni limfocytów potencjalnego dawcy.
- Próba krzyżowa dodatnia
 - oznacza, że w badanej surowicy stwierdzono obecność przeciwciał limfocytotoksycznych wobec antygenów obecnych na powierzchni limfocytów potencjalnego dawcy.
- Próba krzyżowa historyczna dodatnia, bieżąca ujemna
 - oznacza, że w surowicy pobranej w przeszłości (data wskazana na wyniku) wykazano obecność przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom obecnym na powierzchni limfocytów potencjalnego dawcy. W ostatniej dostępnej surowicy nie wykazano obecności przeciwciał limfocytotoksycznych skierowanych przeciwko limfocytom dawcy.
- Próba krzyżowa dodatnia bez DTT, ujemna z DTT
 - Oznacza, że w surowicy biorcy wykazano obecność przeciwciał klasy IgM skierowanych przeciwko antygenom na powierzchni limfocytów potencjalnego dawcy.

Ograniczenia metody

1. Żywotność komórek użytych w badaniu musi być powyżej 90%.
2. Czułość metody jest zależna od miana przeciwciał obecnych w surowicy, przy zbyt niskim reakcja może być fałszywie ujemna.
3. Na wynik badania ma wpływ:
 - zanieczyszczenie zawiesiny limfocytów innymi komórkami (granulocyty, monocyty),
 - aktywność dopełniacza endogennego w surowicach badanych,
 - obecność autoprzeciwciał,
 - obecność przeciwciał krzyżowo reagujących z antygenami HLA,
 - stan surowicy – kompleksy immunologiczne, krioglobuliny, skrzepliny.
4. Uszkodzenie błony komórkowej może nastąpić na drodze innych mechanizmów niż reakcja antygen-przeciwciało-dopełniacz, np. obecność w surowicy czynników toksycznych, zanieczyszczenie mikrobiologiczne, pH wykraczające poza zakres fizjologiczny.

Uwagi

1. Reakcja zależy od obecności jonów wapnia. Obecność EDTA w próbce krwi służącej do izolacji limfocytów może być przyczyną chelatowania jonów wapnia i reakcji fałszywie ujemnej.
2. Obecność przeciwciał limfocytotoksycznych w stosunku do antygenów dawcy wykrywanych przed przeszczepieniem (tzw. preformowanych) jest bezwzględnym przeciwwskazaniem do przeszczepienia nerki.
3. W przypadku wyboru do przeszczepienia pacjenta, u którego miało miejsce zdarzenie potencjalnie immunizujące np. przetoczenie krwi lub jej preparatów w okresie pomiędzy pobraniem surowicy użytej w badaniu a dniem wykonywania próby krzyżowej, konieczne będzie powtórzenie próby krzyżowej przed przeszczepieniem, z wykorzystaniem świeżo pobranej surowicy.
4. Wykrywane przeciwciała mogą mieć swoistość inną niż anty-HLA.
5. Wykrywane przeciwciała należą do klas IgG i IgM.
6. Przeciwciała w klasie IgM nie są przeciwwskazaniem do przeszczepienia nerki jeżeli:
 - są skierowane przeciwko antygenom własnym (autoprzeciwciała) i
 - nie są wynikiem świeżej immunizacji.

Próba krzyżowa - dawca rodzinny

Cel

Wykrycie obecności w surowicy biorcy przeciwciał zdolnych do wiązania dopełniacza skierowanych przeciwko antygenom powierzchniowym limfocytów potencjalnego dawcy (allogeniczne) lub własnych (autologiczne), będących najczęstszą przyczyną nadostrego odrzucania.

Metoda

Test mikrolimfocytotoksyczny zależny od dopełniacza

Materiał do badania

Biorca:

- 5 ml krwi obwodowej pobranej na heparynę (litową lub sodową)
- 5 ml krwi obwodowej pobranej na skrzep

Dawca:

- 5 ml krwi obwodowej pobranej na heparynę (litową lub sodową)
- 5 ml krwi obwodowej pobranej na EDTA

Sposób oceny

Ocena obecności w surowicy biorcy przeciwciał limfocytotoksycznych wobec antygenów obecnych na powierzchni limfocytów potencjalnego dawcy polega na rozróżnieniu komórek żywych/martwych po przeprowadzeniu reakcji: antygen (na limfocytach potencjalnego dawcy)-przeciwciało (w surowicy potencjalnego biorcy przeszczepu)-dopełniacz.

Sposób formułowania wyniku

- Próba krzyżowa ujemna
 - oznacza, że w badanej surowicy nie stwierdzono obecności przeciwciał limfocytotoksycznych wobec antygenów obecnych na powierzchni limfocytów potencjalnego dawcy
- Próba krzyżowa dodatnia
 - oznacza, że w badanej surowicy stwierdzono obecność przeciwciał limfocytotoksycznych wobec antygenów obecnych na powierzchni limfocytów potencjalnego dawcy
- Próba krzyżowa autologiczna dodatnia
 - oznacza, że badanie z własnymi komórkami biorcy wykazało obecność przeciwciał przeciwko antygenom na powierzchni limfocytów biorcy.

Ograniczenia metody

1. Żywotność komórek dawcy musi być >90%
2. Czułość metody jest zależna od miana przeciwciał obecnych w surowicy, przy zbyt niskim reakcja może być fałszywie ujemna.
3. Na wynik badania ma wpływ:
 - zanieczyszczenie zawiesiny limfocytów innymi komórkami (granulocyty, monocyty),
 - aktywność dopełniacza endogennego w surowicach badanych,
 - obecność autoprzeciwciał,

- obecność przeciwciał krzyżowo reagujących z antygenami HLA,
 - stan surowicy – kompleksy immunologiczne, krioglobuliny, skrzepliny.
 - obecność czynników chelatujących np. EDTA w próbce krwi służącej do izolacji limfocytów może być przyczyną reakcji fałszywie ujemnej.
4. Uszkodzenie błony komórkowej może nastąpić na drodze innych mechanizmów niż reakcja antygen-przeciwciało-dopełniacz, np. obecność czynników toksycznych, zanieczyszczenie mikrobiologiczne, pH wykraczające poza zakres fizjologiczny.

Uwagi

1. Przeciwciała skierowane przeciwko innym niż własne biorcy antygenom HLA mogą powstawać w wyniku immunizacji w czasie ciąży, przetoczeń krwi, przeszczepienia narządu lub celowej immunizacji.
2. Wykrywane przeciwciała należą do klas IgG i IgM. Odróżnienie przeciwciał klasy IgG i IgM możliwe jest dzięki użyciu ditiotreitolu (DTT), odczynnika rozbijającego mostek dwusiarczkowy w pentamerze IgM, w wyniku czego przeciwciała tracą zdolność wiązania dopełniacza.
3. Wykrywane przeciwciała mogą mieć swoistość inną niż anty-HLA.
4. Obecność przeciwciał limfocytotoksycznych w stosunku do antygenów dawcy wykrywanych przed przeszczepieniem (tzw. preformowanych) jest bezwzględnym przeciwwskazaniem do przeszczepienia nerki.
5. W przypadku zdarzeń potencjalnie immunizujących (np. przetoczenia krwi lub jej preparatów), w okresie pomiędzy datą surowicy użytej w badaniu a potencjalnym terminem przeszczepienia konieczne będzie powtórzenie próby krzyżowej z wykorzystaniem świeżo pobranej surowicy. Przeciwciała o krzyżowej reaktywności z antygenami zgodności tkankowej potencjalnego dawcy mogą również powstać w następstwie infekcji.

Próba krzyżowa (cross-match) oceniana metodą cytometrii przepływowej (FCXM)

Cel

Wykrycie przeciwciał obecnych w surowicy biorcy narządu przeszczepionego wiążących się z antygenami limfocytów dawcy narządu, określenie subpopulacji limfocytów docelowych i oznaczenie klasy immunoglobulin, do których należą te przeciwciała. Obecność przeciwciał wykrywanych w próbie krzyżowej analizowanej z wykorzystaniem cytometrii przepływowej jest czynnikiem ryzyka odrzucania przeszczepu.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Biorca:

— 5 ml krwi obwodowej pobranej na skrzep pobranej bezpośrednio przed przeszczepieniem

Dawca zmarły:

— Limfocyty izolowane z węzłów chłonnych lub śledziony (materiał wykorzystany do próby krzyżowej),

Dawca rodzinny:

— Limfocyty izolowane z krwi obwodowej (materiał wykorzystany do próby krzyżowej)

Sposób oceny

Swoiste dla antygenów dawcy przeciwciała w surowicy biorcy wiążą się z antygenami na powierzchni limfocytów dawcy. Obecność powstałego kompleksu antygen-przeciwciała można oznaczyć za pomocą znakowanego fluorescencyjnie przeciwciała poliklonalnego skierowanego przeciwko związanym z antygenem na powierzchni komórek biorcy przeciwciałom klasy IgG lub IgM (tzw. koniugat). Oceniana jest fluorescencja kompleksu antygen-przeciwciała-koniugat i porównywana z fluorescencją próby kontrolnej (surowica biorcy zastępowana jest surowicą kontrolną negatywną, w której nie wykryto obecności przeciwciał antylimfocytarnych).

Sposób formułowania wyniku

- Dodatnia/Ujemna, z rozróżnieniem klasy przeciwciał (IgG i/lub IgM) oraz komórek docelowych (limfocyty T/limfocyty B)

Ograniczenia metody

Nie jest możliwa identyfikacja antygenów przeciwko którym wykrywane są przeciwciała obecne w surowicy biorcy.

Uwagi

1. Wynik dodatni nie jest bezwzględnym przeciwwskazaniem do przeszczepienia.
2. Wykrycie obecności przeciwciał w klasie IgM może świadczyć o obecności autoprzeciwciał lub świeżej immunizacji biorcy.

Diagnostyka zaburzeń odporności z wykorzystaniem cytometrii przepływowej

Poszczególne badania zostały przedstawione w postaci tzw. paneli, z których każdy został osobno wyceniony. Na zleceniu można wskazać więcej niż jeden panel. W większości przypadków minimalna objętość próbki krwi obwodowej wynosi 1,2 ml, z wyłączeniem pacjentów z głęboką limfopenią, u których należy pobrać większą ilość materiału do badania. W przypadku zlecenia więcej niż jednego panelu należy skonsultować się z Pracownią w celu ustalenia niezbędnej ilości materiału. Badania wymagające zawsze większej ilości materiału zostały odpowiednio opisane.

Panel Mini (Limfocyty T, B, NK)

Cel

Ustalenie rozkładu odsetkowego podstawowych populacji leukocytów (limfocyty, monocyty, granulocyty) i limfocytów krwi obwodowej, określenie proporcji poszczególnych populacji komórkowych względem siebie oraz liczb bezwzględnych badanych subpopulacji limfocytów i porównanie ich do wartości referencyjnych w monitorowaniu leczenia przeciwciałami monoklonalnymi (np. anty-CD20) lub poliklonalnymi (np. ATG)

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Rozkład odsetkowy populacji leukocytów (limfocyty/monocyty/komórki wielojądrzaste)
- Odsetek i liczba limfocytów w mm³
 - T CD3+
 - B CD19+
 - NK CD16.56+CD3-
 - T o fenotypie NK CD16.56+CD3+

Wartości referencyjne

- Przed leczeniem - zależne od wieku, każdorazowo wskazane na wyniku
- Leczenie przeciwciałami mono lub poliklonalnymi - oczekiwana wartość przed dawką dla badanych populacji zależy od rodzaju monitorowanej terapii

Ograniczenia metody

Próbki materiału do badań należy pobierać przed podaniem dawki leku.

Uwagi

1. Skład odsetkowy subpopulacji limfocytów krwi obwodowej zależy od wieku i może zmieniać się w wyniku działania stresu, aktywności fizycznej, warunków środowiskowych, stanu odżywienia, a także w rytmie dobowym. Interpretacja wyników wymaga odniesienia do odpowiednich wartości referencyjnych pochodzących z badania dużych populacji zdrowych osób.
2. Przeciwciała monoklonalne anti-CD20 interferują z receptorem CD20. Dlatego do oznaczenia liczby limfocytów B wykorzystywane jest przeciwciało anti-CD19.
3. Deplecja limfocytów B po zakończeniu leczenia przeciwciałem monoklonalnym CD20 może utrzymywać się przez długi okres czasu.

Panel podstawowy (T, B, NK, T pom., T supr., CD4:CD8)

Cel

Ustalenie rozkładu odsetkowego podstawowych populacji leukocytów (limfocyty, monocyty, granulocyty) i limfocytów krwi obwodowej, określenie proporcji poszczególnych populacji komórkowych względem siebie oraz liczb bezwzględnych badanych subpopulacji limfocytów i porównanie ich do wartości referencyjnych. Wyniki pozwalają na ukierunkowanie dalszej diagnostyki u pacjentów z objawami klinicznymi wskazującymi na zaburzenia odporności.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Rozkład odsetkowy populacji leukocytów (limfocyty/monocyty/komórki wielojądrzaste)
- Odsetek i liczba limfocytów w mm³

- T CD3+
- T CD4+
- T CD8+
- T CD4+CD8+
- CD4+:CD8+
- B CD19+
- NK CD16.56+CD3-
- T o fenotypie NK CD16.56+CD3+

Wartości referencyjne

Zależne od wieku – każdorazowo wskazane na wyniku.

Ograniczenia metody

1. Nie jest możliwe ocenienie charakterystyki funkcjonalnej wykrytych komórek.

Uwagi

1. Skład odsetkowy subpopulacji limfocytów krwi obwodowej zależy od wieku i może zmieniać się w wyniku działania stresu, aktywności fizycznej, warunków środowiskowych, stanu odżywienia, a także w rytmie dobowym. Interpretacja wyników wymaga odniesienia do odpowiednich wartości referencyjnych pochodzących z badania dużych populacji zdrowych osób.
2. Limfopenia występuje często wtórnie m.in. w pierwszej fazie chorób infekcyjnych, w sytuacjach stresowych (po operacjach, wysiłku fizycznym, w ciąży) oraz w szeregu jednostkach chorobowych nie zaliczanych do pierwotnych niedoborów odporności (AIDS, gruźlica, hipermagnezemia, ziarnica złośliwa, mocznica, zespoły popromienne, zespoły wstrząsowe (np. przy wstrząsie anafilaktycznym), niedożywienie).
3. Wpływ na wynik badania mają niektóre leki, m.in. immunosupresyjne i cytostatyczne, ACTH, kortykosteroidy, preparaty immunoglobulin i niektóre antybiotyki. Badania należy w miarę możliwości wykonywać w okresie nie stosowania takich leków. W przypadku braku możliwości ich odstawienia – próbkę należy pobrać przed podaniem kolejnej dawki.
4. Przetoczenie pełnej krwi może być przyczyną pojawienia się dwóch populacji limfocytów o różnym rozkładzie badanych subpopulacji.

Limfocyty T dziewicze/pamięci

CD45 jest przezbłonową fosfatazą tyrozynową typu 1, przejawianą na wszystkich komórkach układu krwiotwórczego, z wyjątkiem erytrocytów i płytek krwi. Gen kodujący CD45, *PTPRC*, zbudowany jest z 34 egzonów, z których 3 (4,5,6) podlegają alternatywnemu składaniu transkryptu, dając początek izoformom białka różniącym się poziomem glikozylacji. Izoformy CD45 wykazują ekspresję charakterystyczną dla rodzaju komórek oraz ich stopnia zróżnicowania: komórki dziewicze przejawiają izoformę CD45RA z najdłuższym łańcuchem wielocukrowym, komórki pamięci – izoformę CD45RO z najkrótszym łańcuchem wielocukrowym. Z wiekiem i kontaktem z antygenami rośnie odsetek komórek CD45RO+ a maleje odsetek komórek przejawiających ekspresję CD45RA. Komórki pamięci CD45RO+ mogą ponownie przejawiać ekspresję CD45RA - ich ilość rośnie z wiekiem, u pacjentów z przewlekłymi zakażeniami wirusowymi i w przewlekłych chorobach zapalnych.

Cel

Badanie umożliwia wstępną ocenę stopnia dojrzałości limfocytów T na podstawie ekspresji izoform RA i RO molekuly CD45.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Odsetek limfocytów T CD4+ i T CD8+ przejawiających ekspresję izoform CD45A i CD45RO.

Wynik wyrażany jako odsetek badanej populacji limfocytów (T CD4+ lub T CD8+) oraz liczba bezwzględna komórek w mm³.

Wartości referencyjne

Zależne od wieku – każdorazowo wskazane na wyniku

Ograniczenia metody

1. Brak możliwości oceny czynnościowej
2. Badanie nie pozwala na szczegółową ocenę dojrzewania limfocytów T w obwodowych tkankach limfatycznych.

Uwagi

1. Suma odsetków limfocytów T danej subpopulacji przejawiających ekspresję CD45RA i CD45RO powinna w przybliżeniu wynosić ok. 100%.
2. Około 30% pacjentów z ciężkim złożonym niedoborem odporności wykazuje tzw. chimeryzm maczyno-łożowy, tzn. obecność limfocytów T matki, które w okresie życia płodowego zasiedliły organizm dziecka. U dzieci tych stwierdza się wyższe niż należne dla wieku odsetki limfocytów T, szczególnie limfocytów T pomocniczych, przejawiających ekspresję izoformy CD45RO.
3. Możliwa jest równoczesna ekspresja obu izoform, CD45RA i CD45RO, na limfocytach T pamięci aktywowanych przez ten sam antygen, tzw. TEMRA. W przypadku znacznego wzrostu odsetka komórek TEMRA suma odsetków limfocytów T CD45RA+ i CD45RO+ będzie wyższa niż 100.

Dojrzewanie limfocytów T

Limfocyty T dojrzewają w grasicy bez kontaktu z antygenem. Dalsze etapy dojrzewania zależą od kontaktu z antygenem i zachodzą w obwodowych tkankach limfatycznych. Osiągnięcie kolejnych stopni dojrzałości przez limfocyty T wiąże się ze zmianami ekspresji niektórych molekuł powierzchniowych.

Cel

Badanie umożliwia ocenę dojrzewania limfocytów T CD4+ i CD8+ u pacjentów z podejrzeniem zaburzeń rozwojowych w obrębie populacji limfocytów T. Szczególnie przydatne jest w przypadku podejrzenia zaburzeń dojrzewania limfocytów T w grasicy (ocena emigrantów z grasicy) lub w obwodowych tkankach limfatycznych.

Metoda

Cytometria przepływowa - na podstawie oceny różnicowej ekspresji molekuł CD3, CD4 CD8, CD27, CD45RO, CD25, CD127, CD31 i CD45RA.

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

Identyfikacja populacji komórek:

- Limfocyty dziewicze
- Limfocyty pamięci
- Limfocyty efektorowe pamięci
- Limfocyty efektorowe
- Świeże emigranty z grasicy (RTE)
- Limfocyty T pomocnicze regulatorowe

Wynik przedstawiany w postaci wartości odsetkowych w badanych populacjach.

Wartości referencyjne

Zależne od wieku – każdorazowo wskazane na wyniku

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej

Uwagi

Wynik badania stanowi ograniczony opis dojrzewania limfocytów T w obwodowych tkankach limfatycznych.

Rozszerzona ocena dojrzewania limfocytów T

Najbardziej szczegółowa dostępna fenotypowa ocena procesu dojrzewania limfocytów T w grasicy (świeże emigranty z grasicy) i w obwodowych węzłach chłonnych.

Cel

Badanie przydatne jest w diagnostyce wrodzonych ciężkich i złożonych niedoborów odporności będących skutkiem zaburzeń dojrzewania limfocytów T w obwodowych węzłach chłonnych oraz w monitorowaniu pacjentów po przeszczepieniu komórek macierzystych (w szczególności parametr TSCM) i w przewlekłych stanach zapalnych (w szczególności parametr TEMRA).

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

Identyfikacja subpopulacji limfocytów T na podstawie różnicowej ekspresji molekuł CD3, CD4, CD8, CD31, CD45RA, CD45RO, CD27, CD95, CD197 (CCR7):

- Świeże emigranty z grasicy (RTE)
- Komórki pamięci podobne do komórek pnia (TSCM)
- Limfocyty dziewicze
- Limfocyty centralne pamięci
- Limfocyty efektorowe pamięci
- Limfocyty T efektorowe TEMRA (nisko i wysoko zróżnicowane)
- Limfocyty wyczerpane

Wynik przedstawiany w postaci wartości odsetkowych w badanych populacjach.

Wartości referencyjne

Zależne od wieku – każdorazowo wskazane na wyniku

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej.

Uwagi

Rozszerzony panel dojrzewania limfocytów T nie obejmuje oceny komórek regulatorowych.

Receptor TCR

Cechą charakterystyczną limfocytów T jest ekspresja receptora dla antygeny, tzw. TCR. Jest to kompleks wielobiałkowy, w którego skład wchodzi genetycznie zróżnicowany heterodimer $\alpha\beta$ lub $\gamma\delta$, związany niekowalentnie z niezmiennymi dimerami CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$ i CD3 $\zeta\zeta$. Około 90% limfocytów T jest wyposażonych w receptor z heterodimerem $\alpha\beta$, resztę stanowią limfocyty T wyposażone w heterodimer $\gamma\delta$. Receptor TCR rozpoznaje antygeny peptydowe prezentowane przez cząsteczki głównego kompleksu zgodności tkankowej obecne na komórkach prezentujących antygen lub antygeny niepeptydowe prezentowane przez CD1 lub MR1 (patrz rozdziały MHC, MAIT, NKT) .

Cel

Ustalenie odsetka limfocytów T przejawiających ekspresję receptora TCR typu $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- % limfocytów T przejawiających ekspresję receptora TCR $\alpha\beta$
- % limfocytów T przejawiających ekspresję receptora TCR $\gamma\delta$

Wartości referencyjne

Zależne od wieku – każdorazowo wskazane na wyniku

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej

Uwagi

Podwyższony odsetek limfocytów T przejawiających ekspresję receptora TCR $\gamma\delta$ może wskazywać m.in. na aktywną infekcję wirusową lub:

1. Złożony niedobór odporności
2. Hipomorficzne mutacje w genach odpowiedzialnych za proces rearanzacji genów kodujących receptory TCR/BCR
3. Przewlekłe zakażenia i stany zapalne
4. Rekonstytucję immunologiczną po przeszczepieniu komórek macierzystych

Klonalność łańcucha V β receptora TCR

Receptor TCR powstaje w wyniku złożonego procesu rekombinacji segmentów genów odpowiedzialnych za kodowanie odpowiednich fragmentów łańcuchów receptora. Proces ten zachodzi na wczesnych etapach rozwoju limfocyta T w grasicy i jest regulowany przez rekombinazy RAG1 i RAG2. Wymaga też udziału sprawnych mechanizmów pozwalających na naprawę pęknięć w podwójnej nici DNA indukowanych przez rekombinazy.

Cel

Ocena rozkładu subpopulacji limfocytów T, T CD4+ i T CD8+ przejawiających ekspresję poszczególnych łańcuchów TCRV β . Analiza repertuaru TCRV β może być przydatna w chorobach przebiegających ze zwiększoną aktywnością limfocytów T, m.in. np. w chorobach autoimmunologicznych, alloreaktywności po transplantacji, a także odpowiedzi na drobnoustroje i rozrost nowotworowy.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Rozkład limfocytów T, T CD4+ i T CD8+ przejawiających ekspresję łańcuchów V β : 1, 2, 3, 4, 5.1, 5.2, 5.3, 7.1, 7.2, 8, 9, 11, 12, 13.1, 13.2, 13.6, 14, 16, 17, 18, 20, 21.3, 22, 23.

Wartości referencyjne

Niezależne od wieku

Ograniczenia metody

Dostępny komercyjnie zestaw przeciwciał monoklonalnych umożliwia ocenę ok. 70% łańcuchów V β .

Uwagi

1. Na wynik badania może wpływać leczenie preparatami immunoglobulin.
2. Rozkład oligoklonalny oznacza, że doszło do ekspansji co najmniej dwóch populacji badanych komórek różniących się łańcuchem TCR V β , przy ekspresji co najmniej dwa razy większej od górnej granicy wartości referencyjnej dla danego klonu.
 - a. Ekspansję oligoklonalną lub ograniczenie repertuaru obserwowano m.in. w alergii, chorobach autoimmunizacyjnych, infekcjach, nowotworach, niedoborach odporności.
3. Rozkład klonalny TCR V β oznacza, że pojedynczy łańcuch TCR V β przejawiany przez co najmniej 50% komórek z badanej populacji lub że ekspresja danego łańcucha TCR V β wykazuje częstość co najmniej 10-krotnie większą od wartości referencyjnych.
 - a. Ekspansję monoklonalną obserwowano w zaburzeniach limfoproliferacyjnych limfocytów T.
4. W niektórych wrodzonych błędach odporności możliwe jest niewystarczające wykorzystanie łańcuchów TCRV β .
5. W przypadku zlecenia innych badań poza oceną klonalności łańcucha V β receptora TCR konieczne jest pobranie dodatkowej ilości materiału.

Wspólny łańcuch γ receptorów dla IL (CD132)

Wspólny łańcuch γ receptorów dla interleukin chodzi w skład receptorów dla IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 i IL-21. Cytokiny te biorą udział zarówno w odpowiedzi wrodzonej jak i adaptacyjnej, odgrywając rolę w dojrzewaniu limfocytów T, B i NK oraz komórek limfoidalnych układu odporności wrodzonej. Nieprawidłowa budowa lub niezdolność wiązania ligandu do wspólnego łańcucha γ receptorów dla interleukin jest przyczyną ciężkiego złożonego błędu odporności.

Cel

Ocena ekspresji wspólnego łańcucha gamma receptorów dla interleukin na powierzchni limfocytów i ich subpopulacjach u pacjentów płci męskiej z podejrzeniem wrodzonego błędu odporności, u których stwierdzono głęboki niedobór limfocytów T i prawidłową lub podwyższoną ilość limfocytów B oraz u kobiet z podejrzeniem nosicielstwa defektu wiążącego się z zaburzeniami ekspresji produktu zmutowanego genu.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Ekspresja CD132 na limfocytach i ich subpopulacjach T, B, NK

Wartości referencyjne

Niezależne od wieku. Około 50% limfocytów powinno przejawiać ekspresję wspólnego łańcucha γ receptorów dla interleukin.

Ograniczenia metody

Brak zaburzeń ekspresji białka nie wyklucza defektów czynnościowych.

Uwagi

1. Około 50% pacjentów z mutacjami w genie *IL2RG* ma zachowaną śladową lub prawidłową ekspresję białka.
2. U części pacjentów z ciężkim złożonym niedoborem odporności na podłożu defektu w genie *IL2RG* opisano występowanie chimeryzmu maczyno-łożowego oraz spontaniczne rewersje mutacji.
3. Opisano szerokie spektrum fenotypów klinicznych, nawet w obrębie tej samej mutacji, od ciężkiego złożonego niedoboru odporności typu T-B+ do fenotypu łagodnego.

Łańcuch α receptora dla IL7 (IL7R α , CD127)

Interleukina 7 bierze udział m.in. w rozwoju limfocytów T w grasicy, prekursorów limfocytów B w szpiku kostnym i rozwoju komórek dendrytycznych. Receptor dla interleukiny 7 jest heterodimerem, w skład którego wchodzi łańcuch α (CD127) i wspólny łańcuch γ receptorów dla interleukin (CD132). Ekspresja IL-7R α jest przejawiana na wczesnych tymocytach, limfocytach T, prekursorach limfocytów B makrofagach szpiku i innych komórkach układu immunologicznego. Defekty obejmujące IL-7 lub jej receptor powodują głębokie upośledzenie procesu produkcji limfocytów T.

Cel

Ocena ekspresji łańcucha α receptora dla IL-7 u pacjentów z podejrzeniem ciężkiego złożonego niedoboru odporności.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- o Ekspresja CD127 na limfocytach i ich subpopulacjach: limfocytach T, B i komórkach NK.

Wartości referencyjne

Niezależne od wieku. Około 50% limfocytów powinno przejawiać ekspresję łańcucha α receptora dla IL7.

Ograniczenia metody

Brak zaburzeń ekspresji białka nie wyklucza defektów czynnościowych.

Uwagi

1. Badanie wykonywane jest pomocniczo w diagnostyce ciężkiego złożonego niedoboru odporności spowodowanego mutacjami typu loss-of-function w genie *IL7RA*.
2. Niektóre mutacje w genie *IL7RA* nie mają wpływu na ekspresję białka. Opisano pacjentów z częściowym niedoborem (zachowana ekspresja białka) o fenotypie SCID oraz mutacje somatyczne typu gain-of-function u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną.

3. Ekspresja łańcucha α receptora dla IL-7 zależy od populacji: w dużych ilościach przejawiany jest na limfocytach T dziewiczych i pamięci. Komórki efektorowe i regulatorowe przejawiają niską ekspresję IL7R α .
4. Obniżoną ekspresję receptora dla interleukiny 7 mają m.in. komórki wystymulowane poprzez receptor TCR, limfocyty T we krwi obwodowej m.in. w zapaleniu rdzenia i nerwów wzrokowych, limfocyty T pamięci chorych zakażonych wirusem HIV.
5. Brak ekspresji CD127 na limfocytach T CD8+ i obniżoną na CD4+ obserwowano m.in. w zespole Schimke'go.

Markery aktywacji limfocyta T

Limfocyty T aktywowane antygenem przejawiają na swojej powierzchni szereg cząsteczek biorących udział w przekazaniu sygnału aktywacji do jądra komórkowego. Niektóre z tych cząsteczek są presyntetyzowane i składowane w lizosomach sekrecyjnych, inne są syntetyzowane *de novo*. Do cząsteczek przejawianych na powierzchni limfocytów T należą m.in. CD25, CD69, CD71, HLA-DR pojawiających się na powierzchni limfocytów T w różnym czasie od stymulacji.

Cel

Celem procedury jest ocena stopnia aktywacji limfocytów T oraz ich subpopulacji limfocytów T CD4+ i CD8+ mierzonej ekspresją cząsteczek CD25 (wczesna aktywacja) i HLA-DR (późna/przedłużona aktywacja).

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Ekspresja CD25 i HLA-DR na limfocytach T oraz ich subpopulacjach CD4+ i CD8+.

Wartości referencyjne

Wskazane każdorazowo na wyniku

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej

Uwagi

1. Konstytutywna ekspresja CD25 jest cechą charakterystyczną limfocytów T regulatorowych.
2. Ekspresja CD25 (łańcucha α receptora dla interleukiny 2) rośnie w ciągu 12-24 godzin po kontakcie z antygenem, osiągając maksimum po 48-96 godzinach, a następnie maleje w ciągu kolejnych 10-21 dni. Podwyższona ekspresja CD25 może wskazywać na aktywną infekcję.
3. Brak ekspresji łańcucha α receptora dla IL-2 obserwowany jest w u pacjentów z mutacjami w genie *IL2RA*.
4. Konstytutywna ekspresja HLA-DR jest cechą charakterystyczną limfocytów B i monocytów krwi obwodowej.
5. Ekspresja HLA-DR rośnie w ciągu 48-60 godzin po stymulacji antygenem.

6. Brak ekspresji HLA-DR obserwowany jest u chorych z zespołem nagich limfocytów typu 2.
7. Podwyższona ekspresja HLA-DR obserwowana jest m.in. w:
 - a. Zespole Omenna
 - b. Złożonych niedoborach odporności
 - c. Wrodzonych błędach odporności z zaburzeniami regulacji
 - d. Pospolitym zmiennym niedoborze odporności z towarzyszącą autoimmunizacją lub rozstrzeniemiem oskrzeli
 - e. Niedoborze LRBA, CTLA4, zespole autoimmunizacyjnym z limfoproliferacją (ALPS)
8. Na wynik badania mają wpływ niektóre leki, w tym immunosupresyjne i kortykosteroidy, a także przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko receptorowi dla IL-2.

Efektorowe limfocyty T (TH1/ TH2/ TH9/ TH17/ TH17.1 /TH22 /THG/TFH1 /TFH2 /TFH17/TFH17.1)

Limfocyty T pomocnicze efektorowe uczestniczą w odpowiedzi adaptacyjnej dzięki zdolności do produkcji cytokin wpływających na aktywność innych komórek układu immunologicznego. Komórki te identyfikowane są za pomocą badania ekspresji produkowanych cytokin lub charakterystycznego układu ekspresji receptorów dla chemokin.

Cel

Celem procedury jest ocena rozkładu subpopulacji limfocytów T pomocniczych i T pomocniczych grudkowych uczestniczących w odpowiedzi efektorowej na podstawie ekspresji charakterystycznej kombinacji receptorów dla chemokin.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Rozkład odsetkowy w populacji limfocytów pomocniczych:
 - Limfocyty T pomocnicze Th1
 - Limfocyty T pomocnicze Th2
 - Limfocyty T pomocnicze Th9
 - Limfocyty T pomocnicze Th17
 - Limfocyty T pomocnicze Th17.1
 - Limfocyty T pomocnicze Th22
 - Limfocyty T pomocnicze ThG
 - Limfocyty T pomocnicze grudkowe TFH1
 - Limfocyty T pomocnicze grudkowe TFH2
 - Limfocyty T pomocnicze grudkowe TFH17

- Limfocyty T pomocnicze grudkowe TFH17.1

Wartości referencyjne`

Zależne od wieku. Wynik przedstawiany w postaci liczbowej i wykresu wartości badanych w odniesieniu do wartości referencyjnych.

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej w postaci identyfikacji cytokin produkowanych przez badaną populację komórkową.

Uwagi

1. Poszczególne populacje identyfikowane są na podstawie ekspresji charakterystycznej fluorescencji związanej z ekspresją receptorów dla chemokin.
2. Ze względu na szczególne wymogi dotyczące wyboru pacjentów do grupy kontrolnej - wartości referencyjne zostały opracowane na stosunkowo niewielkich grupach pacjentów. Z tego powodu niewielkie odchylenia od wartości referencyjnych wymagają szczególnej uwagi w zakresie interpretacji przez lekarza.

MAIT

Limfocyty MAIT są podobne do komórek odpowiedzi wrodzonej. Wykazują zdolność do szybkiej odpowiedzi cytotoksycznej i sekrecji cytokin Th1 i Th17 w ciągu kilku godzin po rozpoznaniu antygeny pochodzącego od drobnoustrojów. Dzięki zdolności do rozpoznawania metabolitów ryboflawiny (witaminy B) MAIT uczestniczą w odpowiedzi m.in. na bakterie z rodzaju *Escherichia coli*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, oraz drożdże np. *Candida* i *Saccharomyces*. MAIT mogą też walczyć z bakteriami antybiotykoopornymi dzięki produkcji granzymu B i granulizyny. Zdolność do produkcji silnych mediatorów odpowiedzi cytotoksycznej umożliwia MAIT udział w eliminacji pasożytów wewnątrzkomórkowych. MAIT uczestniczą też w odpowiedzi na zaburzenia metaboliczne, choroby zapalne i nowotwory, a także naprawie uszkodzeń tkanek barierowych.

Cel

Celem procedury jest identyfikacja nieklasycznych limfocytów T przejawiających ekspresję łańcucha α receptora TCR typu 7.2 tzw. MAIT.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Odsetek nieklasycznych limfocytów MAIT oraz ich subpopulacji przejawiających ekspresję koreceptora CD8 $\alpha\alpha$, CD8 $\alpha\beta$, CD8 $\beta\beta$, CD4, lub nie przejawiających ekspresji CD4 ani CD8.

Wartości referencyjne

Wskazane każdorazowo na wyniku

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej

Uwagi

1. Zaburzenia ilościowe limfocytów MAIT obserwowane są m.in. w zakażeniach bakteryjnych, zakażeniach wirusowych, chorobach autoimmunologicznych, chorobach zapalnych, ale także u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby, schyłkową niewydolnością wątroby.
2. Niedobór krążących limfocytów MAIT obserwowany jest m.in. u pacjentów z mutacjami w genach *MR1*, *IKZF1* (AR), *RORC*, *ZAP70*.
3. Podwyższony odsetek MAIT obserwowany jest m.in. w mutacjach w genie *REL*.

FOXP3

FoxP3 jest głównym czynnikiem transkrypcyjnym regulującym powstawanie i funkcję komórek regulatorowych (Treg), hamujących nadmierną reakcję na antygen lub odpowiedź na autoantgeny. Jest to populacja heterogenna, a zawartość FoxP3 różni się w poszczególnych subpopulacjach Treg. Zawartość FoxP3 odpowiada za stabilność funkcji komórek regulatorowych. Zaburzenia ilościowe lub czynnościowe komórek regulatorowych odpowiadają za rozwój autoimmunizacji i tzw. tregopatie. Mutacje w genie kodującym FoxP3 odpowiadają za rozwój sprzężonego z chromosomem X zespołu IPEX związanego z zaburzeniami regulacji procesów immunologicznych, poliendokrynopatią i enteropatiami.

Cel

Celem procedury jest ocena ekspresji czynnika transkrypcyjnego FoxP3 w subpopulacjach limfocytów T CD4+.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa – 2,7 ml (EDTA)

Badane parametry

- Odsetek komórek regulatorowych identyfikowanych jako limfocyty T CD4+CD25+CD127-
- Odsetek limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+CD127- przejawiających ekspresję FoxP3
- Odsetek limfocytów T pomocniczych aktywowanych CD4+CD25+
- Odsetek limfocytów T pomocniczych aktywowanych CD4+CD25+przejawiających ekspresję FoxP3
- Odsetek limfocytów T pomocniczych przejawiających ekspresję FoxP3

Wartości referencyjne

Wartości referencyjne zależne od wieku. Każdorazowo wskazane na wyniku.

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej

Uwagi

1. Ekspresja FoxP3 jest cechą charakterystyczną limfocytów T pomocniczych regulatorowych, ale nie jest ograniczona do tej subpopulacji.
2. FoxP3 przejawiany jest również przez niektóre limfocyty T CD8+, komórki NKT, limfocyty B, a także limfocyty T aktywowane.
3. Całkowity niedobór FoxP3 jest cechą charakterystyczną sprzężonego z chromosomem X zespołu zaburzeń regulacji z poliendokrynopatią i enteropatią.
4. Zachowanie ekspresji FoxP3 nie wyklucza niedoboru IPEX. Niektóre mutacje w *FoxP3* nie powodują zmian w ekspresji białka.
5. Ekspresja FoxP3+ może być obniżona w niektórych wrodzonych błędach odporności innych niż IPEX, m.in. spowodowanych mutacjami w genach *STAT3*, *LRBA*, *BACH2*.
6. Badanie może być przydatne w monitorowaniu pacjentów po przeszczepieniu macierzystych komórek krwiotwórczych.

TFH/TFR

Limfocyty T grudkowe pomocnicze (TFH) pełnią istotną rolę w odpowiedzi humoralnej, w szczególności zależnej od ośrodków rozmnażania i różnicowania limfocytów B do długo-żyjących limfocytów B i komórek plazmatycznych we wtórnych tkankach limfatycznych. Limfocyty T grudkowe regulatorowe (TFR) pełnią rolę w regulowaniu komórek TFH oraz limfocytów B. Dzięki produkcji cytokin (IL-4, IL-21, IL-9, IL-10) TFH pomagają limfocytom B w efektywnym generowaniu swoistych przeciwciał w odpowiedzi na zakażenia wirusowe, bakteryjne, pasożytnicze i grzybicze. TFR przejawiają negatywną funkcję regulatorową zarówno wobec TFH jak i limfocytów B ośrodka rozmnażania oraz działają supresyjnie na produkcję przeciwciał swoistych dla antygeny. Badanie wykonywane jest u pacjentów z podejrzeniem zaburzenia regulacji produkcji przeciwciał. Komórki grudkowe obecne we krwi obwodowej mogą różnić się między sobą właściwościami czynnościowymi.

Cel

Celem procedury jest ocena obecności krążących we krwi obwodowej limfocytów TFH oraz TFR.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Odsetek komórek regulatorowych identyfikowanych jako limfocyty T CD4+CD25+CD127-
- Odsetek limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+CD127- przejawiających ekspresję FoxP3
- Odsetek limfocytów T pomocniczych aktywowanych CD4+CD25+
- Odsetek limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+
- Odsetek dziewiczych T regulatorowych TFR CD185-CD25-FoxP3+CD4+
- Odsetek komórek grudkowych TFH CD4+CD185+
- Odsetek komórek grudkowych pomocniczych TFH CD185+CD25-FoxP3-CD4+

- Odsetek komórek grudkowych regulatorowych TFR CD185+CD25+FoxP3+CD4+

Wartości referencyjne

Zależne od wieku. Wskazane każdorazowo na wyniku.

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej

Uwagi

1. Badanie dotyczy krążących limfocytów T grudkowych i grudkowych regulatorowych.
2. Wśród limfocytów TFH we krwi obwodowej występują subpopulacje różniące się zdolnościami efektorowymi. Badanie rozkładu tych subpopulacji stanowi część panelu oznaczonego jako efektorowe limfocyty T.

Panel CVID (Dojrzewanie limfocytów B na obwodzie)

Cel

Ocena stadiów dojrzewania limfocytów B w obwodowych tkankach limfatycznych. Badanie wykonywane w celu ustalenia etapu, na którym doszło do zaburzenia dojrzewania limfocytów B. Zakres badania obejmuje parametry objęte klasyfikacjami pospolitego zmiennego niedoboru odporności: paryską, freiburską i Euroclass.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

Wartości odsetkowe i liczby bezwzględne* subpopulacji limfocytów B:

- niedojrzałe limfocyty B CD21^{low}
- aktywowane limfocyty B CD21^{low} CD38^{low}
- limfocyty B przejściowe (świeże emigranty ze szpiku)
- dziewicze limfocyty B
- naturalne efekторы/podobne do zasiedlających strefę brzeżną (nie-przełączone, non-switched)
- IgM-only memory w populacji limfocytów B pamięci
- IgM-only memory w populacji limfocytów B
- Komórki B pamięci typu switched (zdolne do produkcji immunoglobulin innych niż IgM)
- Plazmablasty

*Pod warunkiem równoczesnego zlecenia wykonania badania „panel podstawowy” lub „panel mini”

Wartości referencyjne

Zależne od wieku – każdorazowo wskazane na wyniku

Ograniczenia metody

1. Brak możliwości oceny czynnościowej.
2. Badanie obejmuje główne populacje limfocytów B występujące przed i po kontakcie z antygenem, ale nie umożliwia oceny ich stanu dojrzewania wewnątrz grudki chłonnej.

Uwagi

1. Ocena dojrzewania limfocytów B w obwodowych tkankach limfatycznych możliwa jest do przeprowadzenia wyłącznie u pacjentów, u których obecne są limfocyty B we krwi obwodowej.
2. U pacjentów, u których wykazano mniej niż 1% limfocytów B nie jest możliwe wyliczenie odsetka niedojrzałych limfocytów B (CD21^{low})

CVID rozszerzony (Dojrzewanie limfocytów B na obwodzie)

Cel

Najszersza dostępna ocena dojrzewania limfocytów B w obwodowych tkankach limfatycznych z wykorzystaniem markerów powierzchniowych. Badanie wykonywane w celu ustalenia etapu, na którym doszło do zaburzenia dojrzewania limfocytów B. Zakres badania obejmuje parametry objęte klasyfikacjami pospolitego zmiennego niedoboru odporności: paryską, freiburską i Euroclass. Dodatkowo umożliwia identyfikację zaburzeń dojrzewania limfocytów B w grudce chłonnej i ośrodka rozmnażania.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

Wartości odsetkowe i liczby bezwzględne* subpopulacji limfocytów B:

- niedojrzałe limfocyty B CD21^{low}
- aktywowane limfocyty B CD21^{low} CD38^{low}
- limfocyty B przejściowe (świeże emigranty ze szpiku)
- dziewicze limfocyty B
- naturalne efekторы/podobne do zasiedlających strefę brzezną (nie-przełączone, non-switched)
- IgM-only memory w populacji limfocytów B pamięci
- IgM-only memory w populacji limfocytów B
- Komórki ośrodka rozmnażania
 - Centroblasty
 - Centrocyty
- Komórki B pamięci typu switched (zdolne do produkcji immunoglobulin innych niż IgM)

— Komórki pamięci typowe i atypowe pamięci, przejawiające ekspresję powierzchniową IgG, i IgA

- Plazmablasty
- Komórki plazmatyczne

*ocena liczby komórek poszczególnych stadiów dojrzewania w mm^3 krwi obwodowej wymaga równoczesnego badania całkowitej liczby limfocytów oraz liczby limfocytów B w mm^3 (panel mini lub podstawowy)

Wartości referencyjne

Zależne od wieku – zawsze wskazane na wyniku

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej.

Uwagi

1. Ocena dojrzewania limfocytów B w obwodowych tkankach limfatycznych możliwa jest do przeprowadzenia wyłącznie u pacjentów, u których obecne są limfocyty B we krwi obwodowej.
2. U pacjentów, u których wykazano mniej niż 1% limfocytów B nie jest możliwe wyliczenie odsetka niedojrzałych limfocytów B (CD21^{low})
3. Produkcja przeciwciał klas innych niż IgM zachodzi w przebiegu procesu przełączania klas. Brak zdolności produkowania immunoglobulin danej klasy lub podklasy jest skutkiem nieprawidłowości, które mogły zajść w jednym z wielu mechanizmów uczestniczących w regulowaniu tego procesu.
4. Indukcja produkcji poszczególnych klas przeciwciał wymaga dostępu do odpowiednich cytokin indukujących przełączenie klas produkowanych immunoglobulin.
5. W przypadku znacznie podwyższonego odsetka komórek podwójnie ujemnych (IgD-CD27-) wykrytych w panelu oceny dojrzewania limfocytów B, oceniana jest dodatkowo ekspresja markerów różnicujących komórki niedojrzałe od wykazujących cechy kontaktu z antygenem (FAS=CD95) lub zdolności zasiedlania obwodowych tkanek limfatycznych (CXCR3=CD183).

Szpik – dojrzewanie linii komórkowych

Cel

Badanie wykonywane jest w przypadkach podejrzenia zaburzeń hematopoezy skutkujących zaburzeniami dojrzewania poszczególnych populacji komórkowych obecnych w szpiku. Badanie jest ukierunkowane na ocenę dojrzewania prekursorów limfocytów B i jest szczególnie przydatne w diagnostyce agammaglobulinemii. Dodatkowo oceniane są pozostałe populacje limfocytów obecnych w szpiku oraz dojrzewanie linii mieloidalnej.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

1. Próbką szpiku, pobranego z różnych miejsc, korzystnie jeśli są to same grudki, w objętości ok. 2 ml, do probówek z antykoagulantem.
2. Preferowanym antykoagulantem jest heparyna sodowa lub heparyna bez konserwantów.

Badane parametry

Ocena składu populacji limfocytów, komórek monocytoidalnych oraz leukocytów wielojądrzastych oraz osiągniętych przez nie etapów dojrzewania. W populacji limfocytów oceniane są:

- Limfocyty T –
 - ekspresja molekuł pan-T (CD2, CD3, CD5, CD7),
 - subpopulacje limfocytów T CD4+, CD8+,
 - ekspresja markerów aktywacji limfocytów T: CD25, HLA-DR
 - ekspresja receptorów TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$
- Komórki NK
- Limfocyty B
 - Ekspresja molekuł CD22, CD79a, CD19, CD20.
 - Ekspresja łańcuchów lekkich κ i λ
 - Rozkład prekursorów limfocytów B
 - pro-B (s1, s2, s3)
 - pre-BI (s4, s5)
 - pre-BII (s6, s7)
 - niedojrzałe (s8)
 - dojrzałe limfocyty B (s9)

Ponadto:

- W populacji komórek mieloidalnych, na podstawie różnic ekspresji molekuł CD34, CD117, CD13, CD33, CD11b, CD16, CD64 wyznaczany jest odsetek komórek odpowiadających fenotypowo
 - mieloblastom
 - promielocytom
 - mielocytom
 - metamielocytom
 - granulocytom z jądrem pałeczkowatym
 - granulocytom z jądrem segmentowanym
- W populacji komórek monocytoidalnych, na podstawie różnic w ekspresji CD34, CD117, CD36, CD16 wyznaczany jest odsetek komórek odpowiadających
 - monoblastom
 - promonocytom
 - monocytom
- W populacji komórek erytroidalnych, na podstawie różnic w ekspresji CD117, CD71, CD235 wyznaczany jest odsetek komórek odpowiadających fenotypowo
 - erytroblastom
 - proerytrocytom

— dojrzałych erytrocytom

Wynik przedstawiany jest w postaci oceny immunofenotypowej rozkładu poszczególnych subpopulacji w obrębie populacji odpowiednio limfocytów, komórek mieloidalnych, monocytoidalnych i erytroidalnych oraz w przeliczeniu na całkowitą populację komórek jądrzastych.

Wartości referencyjne

Zależne od wieku. Wskazane każdorazowo na wyniku

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej

Uwagi

1. Badanie opiera się na ocenie ekspresji markerów charakterystycznych dla poszczególnych populacji. Wynik może nieco różnić się od wyniku klasycznego barwienia hematologicznego.
2. Nazewnictwo stosowane do określenia populacji prekursorów limfocytów B w szpiku używane przez immunologów różni się od stosowanej przez hematologów. Przy interpretacji należy zwracać szczególną uwagę na opis immunofenotypu poszczególnych stadiów dojrzewania.

Szpik – panel chłoniakowy

Cel

Badanie wykonywane jest w przypadku podejrzenia rozrostu z linii limfocytów T i B. Badanie poszerzone w stosunku do oceny dojrzewania linii komórkowych w szpiku o ocenę zaburzeń w zakresie limfocytów T.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

1. Próbkę szpiku, pobranego z różnych miejsc, korzystnie jeśli są to same grudki, w objętości ok. 2 ml, do probówek z antykoagulantem.
2. Preferowanym antykoagulantem jest heparyna sodowa lub heparyna bez konserwantów.

Badane parametry

Ocena składu populacji limfocytów, komórek monocytoidalnych oraz leukocytów wielojądrzastych oraz osiągniętych przez nie etapów dojrzewania na podstawie ekspresji charakterystycznych molekuł powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych. W populacji limfocytów oceniane są:

- Limfocyty T –
 - ekspresja molekuł pan-T (CD2, CD3, CD5, CD7)
 - ekspresja markerów niedojrzałych limfocytów T (CD1a, cytoplazmatyczna ekspresja CD3)
 - ekspresja molekuł charakterystycznych dla komórek proliferujących (CD34, TdT, CD71a)
 - ekspresja CD15, CD30, CD38, CD43, CD56, CD57
 - subpopulacje limfocytów T CD4+, CD8+
 - ekspresja markerów aktywacji limfocytów T: CD25, HLA-DR

- ekspresja receptorów TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$
 - Komórki NK
 - Limfocyty B
 - Ekspresja molekuł CD22, CD79a, CD19, CD20
 - Ekspresja łańcuchów lekkich κ i λ
 - Ekspresja CD5, CD10, CD23
 - Rozkład prekursorów limfocytów B
 - pro-B (s1, s2, s3)
 - pre-BI (s4, s5)
 - pre-BII (s6, s7)
 - niedojrzałe (s8)
 - dojrzałe limfocyty B (s9)
- Ponadto:
- W populacji komórek mieloidalnych, na podstawie różnic ekspresji molekuł CD34, CD117, CD13, CD33, CD11b, CD16, CD64 wyznaczany jest odsetek komórek odpowiadających fenotypowo
 - mieloblastom
 - promielocytom
 - mielocytom
 - metamielocytom
 - granulocytom z jądrem pałeczkowatym
 - granulocytom z jądrem segmentowanym
 - W populacji komórek monocytoidalnych, na podstawie różnic w ekspresji CD34, CD117, CD36, CD16 wyznaczany jest odsetek komórek odpowiadających
 - monoblastom
 - promonocytom
 - monocytom
 - W populacji komórek erytroidalnych, na podstawie różnic w ekspresji CD117, CD71, CD235 wyznaczany jest odsetek komórek odpowiadających fenotypowo
 - erytroblastom
 - proerytrocytom
 - dojrzałym erytrocytom.

Wynik przedstawiany jest w postaci oceny immunofenotypowej rozkładu poszczególnych subpopulacji w obrębie populacji odpowiednio limfocytów, komórek mieloidalnych, monocytoidalnych i erytroidalnych oraz w przeliczeniu na całkowitą populację komórek jądrzastych.

Wartości referencyjne

Zależne od wieku. Wskazane każdorazowo na wyniku

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej

Uwagi

1. Pracownia nie specjalizuje się w diagnostyce chorób rozrostowych w obrębie układu krwiotwórczego - badanie ma charakter wstępny i umożliwia wyłącznie rozpoznanie dużych nieprawidłowości fenotypowych w zakresie limfocytów T i B.
2. W przypadku znacznej asynchronii ekspresji molekuł charakterystycznych dla poszczególnych stadiów dojrzewania prekursorów limfocytów B nie jest możliwe wyznaczenie rozkładu odsetkowego poszczególnych stadiów dojrzewania prekursorów limfocytów B. W takim przypadku wynik przedstawiany jest w postaci odsetków poszczególnych komórek przejawiających dany marker powierzchniowy/wewnątrzkomórkowy.

Łańcuchy lekkie kappa/lambda

Prawidłowe dojrzałe limfocyty B przejawiają ekspresję powierzchniową łańcuchów lekkich immunoglobulin kappa (κ) lub lambda (λ). Dojrzałe limfocyty B zmienione nowotworowo wykazują restrykcję ekspresji jednego z łańcuchów lekkich.

Cel

Celem procedury jest ocena ekspresji łańcuchów lekkich kappa i lambda na powierzchni limfocytów B. Badanie wykonywane pomocniczo w podejrzeniu limfoproliferacji limfocytów B.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Odsetek limfocytów B przejawiających ekspresję łańcuchów lekkich κ i λ .
- Stosunek $\kappa:\lambda$

Wartości referencyjne

Wskazane każdorazowo na wyniku

Ograniczenia metody

Ocena dotyczy wyłącznie ekspresji powierzchniowej łańcuchów lekkich immunoglobulin na powierzchni limfocytów B krwi obwodowej. Brak zaburzeń ekspresji łańcuchów lekkich na limfocytach B krwi obwodowej nie wykluczenia zmian w tkankach limfatycznych.

Uwagi

1. Ocena ekspresji łańcuchów lekkich immunoglobulin (tj. kappa i lambda) stanowi istotny element w rozpoznawaniu i monitorowaniu rozrostu limfocytów B. Prawidłowe i reaktywne limfocyty B przejawiają ekspresję tych łańcuchów w określonych proporcjach, natomiast limfocyty B zmienione nowotworowo przejawiają nadekspresję jednego z łańcuchów.
2. Wykonanie badania możliwe jest tylko u pacjentów, u których obecne są limfocyty B.

Btk

Kinaza Btk przejawiana jest wewnątrzkomórkowo w limfocytach B, monocytach i płytkach krwi. Ekspresja Btk jest niezbędna do rozwoju i funkcjonowania limfocytów B – jej brak jest przyczyną agammaglobulinemii Brutona. Badanie ekspresji Btk w monocytach jest przydatne u pacjentów, u których brak jest limfocytów B.

Cel

Celem procedury jest ocena ekspresji kinazy tyrozynowej Brutona (Btk) w populacji limfocytów B i monocytów u pacjentów z głębokim niedoborem limfocytów B i podejrzeniem agammaglobulinemii Brutona.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Ekspresja Btk w limfocytach B i monocytach.

Wartości referencyjne

Niezależne od wieku.

Ograniczenia metody

Brak zaburzeń ekspresji białka nie wyklucza defektów czynnościowych.

Uwagi

1. Badanie wykonywane jest u pacjentów płci męskiej, u których odsetek limfocytów B w populacji limfocytów przynajmniej w dwóch kolejnych badaniach nie przekracza 2%.
2. Zachowanie ekspresji Btk nie wyklucza mutacji w genie *BTK*.
3. W przypadku mutacji związanych z zaburzeniami ekspresji białka możliwe jest wykrycie nosicielstwa wady genetycznej u kobiet/dziewczynek.

BAFF-R (TNFRSF13C, CD268)

BAFF-R, czyli receptor 13C z nadrodziny receptorów dla czynnika martwicy nowotworów, kodowany jest przez gen *TNFRSF13C*. Ekspresja receptora BAFF-R jest niezbędna do dojrzewania limfocytów B, ich różnicowania i przeżycia. Ekspresję BAFF-R przejawiają wszystkie stadia dojrzewania limfocytów B na obwodzie, z wyjątkiem komórek plazmatycznych. Ekspresja BAFF-R i BCR jest niezbędna do przeżycia limfocytów B przejściowych i dojrzałych. Niedobór BAFF-R wiąże się z obniżeniem odsetka limfocytów B, zahamowaniem dojrzewania limfocytów B na obwodzie i z gromadzeniem limfocytów B przejściowych.

Cel

Celem badania jest ocena odsetka limfocytów B przejawiających ekspresję BAFF-R.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

Ekspresja

- BAFF-R na limfocytach B
- CD20 na limfocytach B CD19+
- Odsetek limfocytów B w populacji limfocytów.

Wartości referencyjne

Niezależne od wieku. U osób zdrowych ponad 95% limfocytów B przejawia ekspresję BAFFR.

- a. Pozytywna ekspresja BAFF-R na >95% limfocytów
- b. Pozytywna ekspresja CD20+ na limfocytach CD19+:97-99%
- c. Odsetek limfocytów B CD20+ w przybliżeniu równy odsetkowi limfocytów B CD19+

Ograniczenia metody

Brak zaburzeń ekspresji białka nie wyklucza defektów czynnościowych.

Uwagi

1. Obniżona ekspresja BAFF-R obserwowana jest w wielu wrodzonych błędach odporności związanych z zaburzeniami dojrzewania limfocytów B, w niektórych chorobach autoimmunologicznych, stanach zapalnych, infekcjach związanych z nieprawidłowościami w zakresie limfocytów B oraz niektórych nowotworach krwi.
2. Homozygotyczna utrata receptora BAFF-R jest przyczyną wzrostu odsetka komórek B przejściowych oraz hipogammaglobulinemii z zachowanym poziomem IgA.
3. Pacjenci z wrodzonym błędem odporności w wyniku mutacji w genie *BAFFR* mogą wykazywać znacznie obniżoną ekspresję TACI na spoczynkowych i aktywowanych limfocytach T.

TACI (TNFRSF13B, CD267)

Cel

W trakcie odpowiedzi na antygeny grasiczo-niezależne białko TACI indukuje proces przełączenia klas produkowanych immunoglobulin i różnicowanie limfocytów B do komórek plazmatycznych. Ekspresja TACI rośnie po stymulacji receptora BCR poprzez CD40 i receptory TLR. W ośrodkach rozmnażania, w których dochodzi do szybkiej proliferacji limfocytów B, ekspresja TACI maleje pod wpływem działania IL-21.

Celem procedury jest ocena ekspresji białka TACI.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Ekspresja TACI na limfocytach B, limfocytach B pamięci oraz pamięci typu IgM-only memory

Wartości referencyjne

Wskazane każdorazowo na wyniku

Ograniczenia metody

Brak zaburzeń w ekspresji białka nie wyklucza defektów czynnościowych.

Uwagi

1. Zachowanie ekspresji TACI nie wyklucza mutacji w genie *TNFRSF13B*.
2. Pacjenci z mutacjami w genie kodującym TACI mają prawidłowe lub lekko obniżone liczby limfocytów B oraz obniżoną liczbę limfocytów B pamięci typu „switched memory”.
3. Niedobór TACI predysponuje do wystąpienia chorób autoimmunizacyjnych i limfoproliferacji.
4. W niedoborze TACI pacjenci wykazują defekt odpowiedzi grasiczo-niezależnej.

ICOS (CD278)

ICOS (z ang. inducible T cell co-stimulator) odgrywa ważną rolę w regulowaniu odpowiedzi T-zależnej. Przejawiany jest na aktywowanych limfocytach T. Kostymulacja poprzez aktywację ICOS wpływa na funkcję limfocytów T CD4+ ich różnicowanie i proliferację subpopulacji limfocytów TH1, TH2, TH17, T grudkowych i regulatorowych. Bierze udział w interakcji między limfocytami T i B w wyniku której powstają ośrodki rozmnażania.

Niedobór ICOS należy do złożonych niedoborów o szerokim spektrum objawów klinicznych obejmujących nawracające infekcje, enteropatie, autoimmunizacja, limfoproliferację i rozrost nowotworowy. Defekt ma charakter postępujący, z możliwym zachowaniem u dzieci prawidłowej liczby i cech dojrzewania limfocytów B na obwodzie.

Cel

Celem procedury jest ocena ekspresji ICOS (CD278) na stymulowanych limfocytach T.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (heparyna sodowa lub bez konserwantów)

Badane parametry

- Ekspresja CD278 (ICOS) na aktywowanych *in vitro* limfocytach T pomocniczych. W celu weryfikacji skuteczności stymulacji komórek na tych samych komórkach oceniana jest również ekspresja CD69.

Wartości referencyjne

Niezależne od wieku. Większość aktywowanych limfocytów T CD4+ powinno przejawiać ekspresję CD278.

Ograniczenia metody

Brak zaburzeń ekspresji białka nie wyklucza defektów czynnościowych.

Uwagi

1. Antykoagulanty o działaniu chelatującym (np. EDTA) hamują proces aktywacji komórek i negatywnie wpływają na ekspresję CD278.
2. Leki immunosupresyjne obniżają ekspresję CD278.
3. Ekspresja ICOS może być obniżona w niektórych innych wrodzonych błędach odporności m.in. spowodowanych np. mutacjami w genie *CASP9*.
4. Pacjenci z heterozygotycznymi mutacjami w genie kodującym ICOS mają zachowaną ekspresję białka.
5. W niedoborze ICOS obserwuje się obniżenie lub całkowity brak odsetka komórek grudkowych o fenotypie CD4+CXCR5+ oraz zaburzenia ekspresji CTLA-4 na limfocytach T regulatorowych.
6. Ze względów technicznych badanie nie jest wykonywane w dniach poprzedzających dni wolne od pracy.

Cząsteczki adhezyjne (integryny $\beta 2$)

Integryny $\beta 2$ tworzą rodzinę białek przejawianych na leukocytach, których wspólną cechą jest ekspresja podjednostki $\beta 2$ (CD18). Cząsteczki adhezyjne przejawiają jedną z czterech podjednostek α : $\alpha L\beta 2$ (tj. LFA-1, CD11a/ CD18), $\alpha M\beta 2$ (t.j. Mac-1, CR3, CD11b/CD18), $\alpha X\beta 2$ (tj. p150,95 CD11c/ CD18) lub przejawianą włącznie na makrofagach $\alpha D\beta 2$ (tj. CR4, CD11d/CD18).

Zaburzenia ekspresji molekuł adhezyjnych upośledzają zdolność granulocytów i limfocytów do migracji poza naczynia krwionośne, ich udział w reakcji cytotoksycznej oraz fagocytozę bakterii.

Obecnie znane są trzy różne zespoły zaburzeń adhezji: (1) spowodowany zaburzeniami ekspresji białek z rodziny integryn $\beta 2$, (2) spowodowane zaburzeniami ekspresji fukozylowanych ligandów dla selektyn i (3) zaburzeniem aktywacji integryn $\beta 2$ w następstwie mutacji w genie *FERMT3* kodującym kindlinę.

Cel

Celem procedury jest ocena ekspresji składowych integryn $\beta 2$: CD11a, CD11b, CD11c i CD18 na monocytach oraz fukozylowanego białka CD15 na granulocytach.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Odsetek monocytów przejawiających ekspresję: CD11a, CD11b, CD11c, CD18.
- Odsetek granulocytów przejawiających ekspresję CD15s.

Wartości referencyjne

Niezależne od wieku.

Ograniczenia metody

Brak zaburzeń ekspresji białka nie wyklucza defektów czynnościowych.

Uwagi

1. Osłabiona ekspresja podjednostki $\beta 2$ powoduje obniżenie również ekspresji podjednostek α na powierzchni leukocytów.
2. Obniżona ekspresja CD18 lub CD11 może wskazywać na niedobór molekuł adhezyjnych.
 - Ekspresja >10% wskazuje na łagodny niedobór
 - Ekspresja 2%-10% wskazuje na umiarkowany niedobór
 - Ekspresja <2% wskazuje na ciężki niedobór
3. Ekspresja badanych molekuł adhezyjnych może zmniejszać się pod wpływem niektórych leków, m.in. antybiotyków, kortykosteroidów i salicylanów.
4. Ekspresja molekuł adhezyjnych jest niższa we wczesnym okresie po zabiegach operacyjnych.
5. Długi okres transportu lub nadmierne wytrząsanie próbki mogą być przyczyną złuszczenia CD11b z powierzchni komórek. W takich przypadkach badanie należy powtórzyć na świeżej próbce, z uwzględnieniem badania ekspresji CD11b po stymulacji komórek.
6. Zachowanie prawidłowej ekspresji CD11b i/lub CD18 nie wyklucza mutacji w genie *ITBG2*.
7. Opisano łagodniejszą formę zaburzeń adhezji leukocytów typu 2 z częściowo zachowaną ekspresją CD15.

MHC klasa I

Cząsteczki kodowane w obrębie głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC=Major histocompatibility complex), tzw. antygeny HLA, biorą udział w prezentacji antygenów własnych i obcych komórkom układu immunologicznego. Cząsteczki antygenów HLA I klasy- A,B,C obecne są na wszystkich komórkach jądrzastych organizmu i płytkach krwi. Zaburzenia ich ekspresji mogą być skutkiem zaburzeń funkcji białek transportujących TAP lub białka wiążącego białko transportujące zsyntetyzowaną cząsteczkę antygeny HLA do retikulum endoplazmatycznego. Zaburzenia w ekspresji cząsteczek antygenów HLA klasy I określa się nazwą zespołu nagich limfocytów (BLS-bare lymphocyte syndrome) typu I. U większości pacjentów z zaburzeniami ekspresji antygenów HLA klasy I stwierdzane są zmniejszenie liczby komórek T CD8+ i osłabiona aktywność bójcza komórek NK.

Cel

Celem procedury jest ocena ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy I (MHC-I).

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Ekspresja antygenów MHC klasy I na limfocytach

Wartości referencyjne

Wszystkie limfocyty powinny przejawiać ekspresję MHC-I

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej

Uwagi

1. Stosowanie leków immunosupresyjnych obniża ekspresję antygenów HLA klasy I.
2. W przypadku podejrzenia zaburzeń ekspresji korelujących z wynikami pozostałych badań i stanem klinicznym należy wykonać równoległe badanie z wykorzystaniem komórek osoby zdrowej.

MHC klasa II

Cząsteczki kodowane przez główny kompleks zgodności tkankowej (MHC) klasy II są białkami powierzchniowymi, przejawianymi na komórkach prezentujących antygen, w tym na limfocytach B, monocytach, makrofagach, komórkach dendrytycznych. Ekspresja powierzchniowa antygenów MHC klasy II na komórkach innych niż prezentujące antygen wymaga syntezy regulowanej za pomocą szeregu białek regulatorowych. Uwarunkowane genetycznie defekty czynników regulatorowych odpowiadających za ekspresję MHC klasy II są przyczyną zespołu nagich limfocytów typu II,

Cel

Celem procedury jest ocena ekspresji antygenów MHC klasy II.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Ekspresja HLA-DR na limfocytach B i monocytach

Wartości referencyjne

Niezależne od wieku. Wszystkie limfocyty B i monocyty powinny przejawiać ekspresję antygenów głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy II.

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej

Uwagi

1. Stosowanie leków immunosupresyjnych może być przyczyną obniżenia ekspresji antygenów MHC klasy II.
2. Stosowanie statyn i/lub glikokortykosteroidów może być przyczyną osłabienia ekspresji antygenów MHC klasy II na limfocytach B.

3. Brak ekspresji MHC II jest przyczyną zespołu nagich limfocytów.
4. Ekspresja antygenów klasy II na limfocytach T świadczy o ich aktywacji

Receptor dla interferonu γ (IFN γ R1)

Zwiększona częstość zakażeń mykobakteryjnych obserwowana jest m.in. u chorych z mutacjami w genach *CCR2*, *CYBB*, *IFGN*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IKBKG*, *IL12B*, *IL12RB1*, *IL12RB2*, *IL23R*, *IRF1*, *IRF8*, *ISG15*, *JAK1*, *RORC*, *SPPL2A*, *STAT1*, *TBX21*, *TYK2*, *USP18*, *ZNFX1*. Tylko niektóre defekty mogą być wykrywane za pomocą cytometrii przepływowej. Jednym z defektów sprzyjających zwiększonej podatności na zakażenia bakteryjne jest upośledzenie ścieżki aktywacji komórki na drodze IFN γ -IL12. Funkcjonalnie aktywna postać receptora dla interferonu γ składa się z dwu lub więcej podjednostek: podjednostki α (IFN γ R1) odpowiadającej za wiązanie interferonu γ oraz podjednostki β (IFN γ R2 β). Podjednostka α (IFN γ R1) zawiera zewnątrzkomórkową domenę wiążącą ligand oraz domenę wewnątrzkomórkową odpowiedzialną za transdukcję sygnału i recykling receptora. Zewnątrzkomórkowa domena podjednostki β (IFN γ R2) wchodzi w interakcje z kompleksem IFN γ R1/IFN γ , ale nie bierze udziału w wiązaniu ligandu. Za transdukcję sygnału odpowiedzialna jest wewnątrzkomórkowa domena IFN γ R2.

Łańcuch α receptora dla interferonu gamma przejawiany jest na większości komórek człowieka z wyjątkiem dojrzałych erytrocytów, m.in. na monocytach, makrofagach, limfocytach T i B, komórkach NK, neutrofilach, fibroblastach, komórkach naskórka i śródbłonna.

Cel

Celem procedury jest ocena ekspresji łańcucha α receptora dla interferonu γ (CD119) u pacjentów z podejrzeniem genetycznie uwarunkowanej podatności do zakażenia słabo wirulentnymi prątkami lub powikłań zakażenia bakteriami z rodzaju *Listeria* i *Salmonella*, a także wirusami z grupy Herpes (CMV, HSV, VZV).

Metoda

Cytometria przepływową

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Ekspresja CD119 na monocytach.

Wartości referencyjne

Większość monocytów powinna przejawiać ekspresję łańcucha α receptora dla interferonu gamma.

Ograniczenia metody

Brak zaburzeń ekspresji białka nie wyklucza defektów czynnościowych.

Uwagi

1. Mutacje w genie *IFNGR1* mogą wiązać się z całkowitym lub częściowym brakiem ekspresji białka, patologicznym gromadzeniem receptora na powierzchni komórek lub też brakiem zdolności rozpoznawania ligandu ale bez wpływu na ekspresję powierzchniową receptora.
2. Stosowane w badaniu przeciwciała monoklonalne rozpoznaje pozakomórkowy region receptora. Mutacje nie wpływające na strukturę tego odcinka nie są rozpoznawane przez stosowane przeciwciała monoklonalne.

3. Nietypowo wysoka fluorescencja, co najmniej kilkukrotnie przewyższająca najczęściej obserwowaną związaną z barwieniem przeciwciałem anti-CD119, może świadczyć o mutacji autosomalnej dominującej w genie *IFNGR1*.
4. Brak zaburzeń ekspresji CD119 nie wyklucza obecności mutacji w genie *IFNGR1*, ani żadnym innym genie związanym z genetycznie uwarunkowaną podatnością na zakażenia mykobakteriami.

Receptor dla Interleukiny 12 (IL12R β 1)

Zwiększona zachorowalność z powodu zakażeń mykobakteriami atypowymi może być spowodowana m.in. zaburzeniami ekspresji receptora 1 dla interleukiny 12 lub zaburzeniami ekspresji łańcucha Fc γ RIII.

W skład receptora dla IL-12 wchodzi dwa powiązane ze sobą wiązaniem dwusiarczkowym łańcuchy: β 1 (CD212) wspólny dla receptorów dla IL-12 i IL-23 oraz łańcuch β 2. Łańcuchy te wiążą odpowiednio składowe dimeru IL-12: IL-12p40 z łańcuchem β 1 i IL-12p35 z łańcuchem β 2. Łańcuch β 1 jest przejawiany w małych ilościach na wszystkich limfocytach, a w dużych - na komórkach NK i komórkach MAIT. IL12R β 1 przejawiany jest też na komórkach dendrytycznych. Ekspresja IL12R β 1 rośnie na komórkach aktywowanych lub stymulowanych np. IL-2, IL-7, IL-15.

W izolowanym defekcie osi IFN γ -IL12 należy przeprowadzić badanie przesiewowe w kierunku potencjalnie patogennej mutacji w genie kodującym Fc γ RIII z wykorzystaniem przeciwciała anti-CD16 klon N73.1.

Cel

Ocena cytometryczna łańcucha β 1 receptora dla IL12 oraz ekspresji receptora Fc γ RIII.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- o Ekspresja łańcucha β 1 receptora dla IL-12 na komórkach NK oraz aktywowanych limfocytach T (HLA-DR+), a także ekspresja receptora Fc γ RIII .

Wartości referencyjne

Ekspresja CD212 powinna być wykrywana na komórkach NK i aktywowanych limfocytach T.

Odsetek komórek przejawiających receptor Fc dla IgG znakowanych przeciwciałem Leu11c powinien być porównywalny z wynikiem znakowania przeciwciałem Leu11a.

Ograniczenia metody

Brak zaburzeń ekspresji białka nie wyklucza defektów czynnościowych.

Uwagi

1. Przeciwciała anti-IL-12R β 1 (CD212), klon 2-4E6 używane w badaniu wiąże się z kompleksem wiążącym IL-12 aktywowanych limfocytów krwi obwodowej.
2. W badaniach rutynowych ocena ekspresji przeprowadzana jest na limfocytach T aktywowanych in vivo (CD3+HLADR+).

3. W przypadku braku ekspresji CD212 na aktywowanych *in vivo* limfocytach T (CD3+HLADR+) badanie należy powtórzyć po stymulacji *in vitro*. Preferowanym czynnikiem stymulującym jest wówczas fitohemaglutynina.
4. Brak zaburzeń ekspresji łańcucha β 1 receptora dla Interleukiny 12 nie wyklucza mutacji w genie kodującym ten łańcuch, ani żadnym innym genie związanym z genetycznie uwarunkowaną podatnością na zakażenia mykobakteriami.

Receptor dla IL-2

Receptor dla interleukiny 2 jest trimerym w skład którego wchodzi: łańcuch α (CD25), łańcuch β (CD122) oraz wspólny łańcuch γ receptorów dla interleukin (CD132). Łańcuch β przejawiany jest konstytutywnie zewnątrz i wewnątrzkomórkowo przez komórki NK i monocyty, a nasilenie ekspresji rośnie w następstwie aktywacji komórek.

Cel

Celem procedury jest ocena ekspresji łańcucha β receptora dla IL-2.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Ekspresja CD122 na komórkach NK

Wartości referencyjne

Wskazane każdorazowo na wyniku

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej

Uwagi

1. W badaniu cytometrycznym pacjentów z wrodzonymi błędami odporności na tle mutacji w genie *IL2RB* opisywany jest podwyższony odsetek komórek NK o upośledzonym torze dojrzewania, obniżony odsetek komórek regulatorowych i podwyższony odsetek limfocytów T oraz B pamięci.
2. Badaniem pomocniczym w diagnostyce pacjentów z podejrzeniem zaburzeń wynikających z defektu czynnościowego białka kodowanego przez *IL2RB* może być ocena dojrzewania komórek NK. W niedoborze IL2RB obserwowany jest znaczny wzrost odsetka komórek CD56bright (u zdrowych – przewaga CD56dim)

Limfocyty T podwójnie ujemne – DNT

Prawidłowe limfocyty T we krwi obwodowej przejawiające ekspresję receptora TCR $\alpha\beta$ przejawiają również ekspresję jednego z koreceptorów: CD4 lub CD8. Cechą charakterystyczną zespołów limfoproliferacyjnych jest podwyższony odsetek limfocytów T o fenotypie CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8-, tzw. podwójnie ujemnych (DNT).

Cel

Celem badania jest określenie odsetka limfocytów T CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8-. Obecność podwyższonych DNT jest jednym z kryteriów diagnostycznych w zespole limfoproliferacyjnym z towarzyszącymi objawami w postaci autoimmunizacji (ALPS).

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Odsetek limfocytów T z receptorem TCR $\alpha\beta$ nie przejawiających ekspresji CD4 ani CD8:
 - W stosunku do limfocytów T
 - W stosunku do całkowitej liczby limfocytów
- Odsetek limfocytów T przejawiających ekspresję receptora TCR $\alpha\beta$

Wartości referencyjne

Każdorazowo wskazane na wyniku.

Ograniczenia metody

1. Fenotyp CD4-CD8- mają również limfocyty T z receptorem TCR $\gamma\delta$ oraz nieklasyczne limfocyty T typu NKT-I, NKT-II, MAIT.
2. Komórki DNT TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8- mogą być podwyższone w innych jednostkach chorobowych niż zespół autoimmunizacyjny związany z limfoproliferacją, m.in: w chorobach autoimmunologicznych np. toczeniu układowym.

Uwagi

1. Aktualne kryteria diagnostyczne rozpoznania ALPS ustalane są przez odpowiednie gremia międzynarodowe i obejmują parametry kliniczne i laboratoryjne.
2. Należy zwracać uwagę na kolejność bramkowania, tak aby w badaniu oceniać odsetek limfocytów T CD4-CD8- w populacji limfocytów TCR $\alpha\beta$.
3. Do rozpoznania zespołu ALPS nie wystarczy wykazanie podwyższonego odsetka komórek DNT.

CD95 (=FAS)

CD95 pełni ważną rolę w życiu i śmierci komórki, szczególnie w rozwoju limfocytów oraz śmierci indukowanej przez aktywację (AICD). Aktywacja i proliferacja limfocytów zachodzące w przebiegu odpowiedzi immunologicznej skutkują wygenerowaniem komórek efektorowych. Aktywowane limfocyty muszą zostać wyeliminowane w fazie wygaszania odpowiedzi immunologicznej, w sposób zależny od CD95. W zespole limfoproliferacyjnym z autoimmunizacją ALPS liczba limfocytów nie może zostać ograniczona, a komórki podlegają niekontrolowanej proliferacji. Większość pacjentów z ALPS (około 65%) jest nosicielami mutacji heterozygotycznych w genie kodującym CD95 (ALPS typu Ia). Za ALPS odpowiadają też mutacje w genach kodujących inne składniki ścieżki CD95, w tym CD95L (ALPS typ Ib), kaspazę-8 i kaspazę 10 (ALPS typ II), pełniące zasadniczą rolę w ścieżce CD95.

Białko FAS jest przejawiane na niektórych limfocytach T i B, ale nie komórkach NK.

Cel

Ocena ekspresji białka Fas uczestniczącego w przekazywaniu sygnałów kontrolujących zaprogramowaną śmierć komórki.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Ekspresja CD95 na limfocytach T, T CD45RO+ i granulocytach

Wartości referencyjne

Niezależne od wieku. Niemal wszystkie granulocyty powinny wykazywać ekspresję CD95.

Ograniczenia metody

Brak zaburzeń ekspresji białka nie wyklucza defektów czynnościowych.

Uwagi

1. Funkcjonalnie sprawny receptor FAS jest homotrimerem.
2. Ekspresja Fas może zależeć od licznych czynników egzogennych i endogennych, w tym działania czynników infekcyjnych, promieniowania γ , chemioterapii, cytokin, m.in. interferonu γ , TNF α , interleukiny 7, 1b, 1 i IL6 lub ich kombinacji, a także pod wpływem tlenu azotu.
3. Endotoksemia niewielkiego stopnia powoduje początkowo osłabienie, a następnie znaczne nasilenie ekspresji CD95 na leukocytach.
4. Pod wpływem IL-7 może dochodzić do nasilenia ekspresji CD95 na limfocytach T CD4+ pamięci.
5. Ekspresja CD95 może być osłabiona w przebiegu zakażenia adenowirusem, wtórnie do nasilonej internalizacji receptora związanego z wirusem.
6. W przewlekłym zakażeniu wirusem HBV może dochodzić do obniżenia ekspresji CD95.
7. W niektórych mutacjach w genie kodujących FAS możliwe jest obniżenie fluorescencji, bez zmian odsetka komórek przejawiających ekspresję CD95.
8. Suboptymalna odpowiedź limfocytów T CD8 może się wiązać z nasileniem ekspresji CD95.

Ligand dla CD95 (CD95L=CD178)

FASL jest białkiem transmembranowym tworzącym homotrimer przejawiany na limfocytach T cytotoksycznych. W postaci receptora związanego z błonami komórkowymi występuje na aktywowanych limfocytach T i komórkach NK oraz na komórkach tkanek uprzywilejowanych immunologicznie takich jak oko, macica, łożysko, płuca, tyreocyty, histocyty CD68+ w skórze, tarczki międzykręgowe. W warunkach fizjologicznych CD95L kontroluje różnicowanie linii erytroidalnej, angiogenezę oka, homeostazę skóry, zależne od limfocytów cytotoksycznych zabijanie komórek zainfekowanych wirusem lub transformowanych nowotworowo.

Cel

Celem procedury jest ocena ekspresji ligandu dla białka Fas przejawianego na aktywowanych limfocytach T i komórkach NK.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Ekspresja CD178 na aktywowanych limfocytach T (HLA-DR+) oraz komórkach NK.

Wartości referencyjne

Niezależne od wieku

Ograniczenia metody

Brak zaburzeń ekspresji białka nie wyklucza defektów czynnościowych.

Uwagi

Dla uzyskania sprawności funkcjonalnej białka konieczne jest utworzenie homotrimeru. Obniżona fluorescencja może wskazywać na problemy w tworzeniu lub funkcjonowaniu trimeru.

CD57

W aktywnym zakażeniu krętkiem *Borellia* wykazano istotne zmiany w subpopulacjach limfocytów T, z obniżeniem we krwi obwodowej odsetka limfocytów CD4+ i CD8+, a także spadkiem odsetka komórek NK, bez istotnej normalizacji po przeprowadzonym leczeniu. Wg niepotwierdzonych doniesień chorzy z przewlekłą postacią boreliozy mają obniżoną liczbę komórek NK definiowanych obecnością markera CD57, tj. CD3-CD57+, a monitorowanie zmian w liczbie tych komórek miałyby służyć monitorowaniu odpowiedzi na leczenie, ulegających normalizacji po skutecznym zakończeniu leczenia.

Cel

Ocena ekspresji cząsteczek CD57 na limfocytach za pomocą cytometrii przepływowej.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- rozkład odsetkowy leukocytów
- odsetek i liczba limfocytów T, B i NK, T CD4+ i T CD8+
- odsetek limfocytów CD57+ CD3-
- odsetek limfocytów CD57+CD8+

- odsetek limfocytów CD56+CD57+
- odsetek limfocytów CD56+CD3-
- odsetek limfocytów CD57+

Wartości referencyjne

Zależne od wieku – każdorazowo wskazane na wyniku

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej

Uwagi

1. Ekspresja CD57 jest charakterystyczna dla końcowej fazy dojrzewania komórek NK oraz limfocytów T CD8+.
2. Wyniki badań wskazujących na rolę komórek NK w zakażeniu krętkiem *Borellia* nie zostały potwierdzone w żadnych uznanych badaniach klinicznych. Wynik badania nie potwierdza, ani nie wyklucza zakażenia krętkiem *Borellia*.
3. Spadek komórek CD57+ obserwowany jest m.in. w łysieniu plackowatym, atopowym zapaleniu skóry, zespole Sjögrena, w nefropatii IgA, w łuszczycy.
4. Odsetek limfocytów CD57+ wzrasta u osób starszych, a także m.in. w zakażeniu CMV, wirusem Chikungunya, wirusem Hanta, wirusem HBV i HCV, HIV oraz po przeszczepieniu szpiku i narządów unaczynionych, w reumatoidalnym zapaleniu stawów.
5. Wzrost odsetka CD8+CD57+ obserwowany jest m.in. w zakażeniu CMV, HIV, HCV, EBV, parwowirusem, wirusem odry oraz w gruźlicy płuc, toksoplazmozie.

iNKT

Komórki iNKT (invariant natural killer T (iNKT)) = komórki T o fenotypie NK, przejawiające częściowo niezmienny receptor TCR) należą do heterogennej grupy komórek T o fenotypie NK przejawiających cechy zarówno komórek NK jak i limfocytów T, stanowiących pomost pomiędzy mechanizmami odpowiedzi wrodzonej i adaptacyjnej. iNKT wykazują restrykcję CD1d, ekspresję niezmiennego łańcucha α receptora TCR i ekspresję ograniczonego repertuaru łańcuchów β rozpoznających antygeny lipidowe. Komórki iNKT bardzo szybko odpowiadają produkcją cytokin na stymulacje antygenami lipidowymi. Rodzaj produkowanych cytokin zależy od czynnika stymulacyjnego. We krwi krążącej iNKT stanowią około 1% limfocytów T.

Cel

Celem badania jest ocena odsetka limfocytów iNKT ich subpopulacji CD4+, CD8+ oraz CD4-CD8-.

Materiał badany

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Odsetek limfocytów T przejawiających ekspresję receptora TCR z niezmiennymi łańcuchami V α i V β tj. TCRV α 24V β 11 oraz ich subpopulacji CD4+, CD8+, CD4-CD8-.

Wartości referencyjne

Zależne od wieku – każdorazowo wskazane na wyniku

Ograniczenia metody

Brak możliwości oceny czynnościowej

Uwagi

1. Obniżone odsetki komórek iNKT lub ich brak opisano m.in. we wrodzonych błędach odporności na tle mutacji w genach kodujących SAP, XIAP, kinazę ITK, a także Cernunnos, IL6ST i CD27
2. Zgodnie z roboczymi kryteriami diagnostycznymi ESID, obniżenie iNKT oznacza obniżenie poniżej 0,02% limfocytów T.

CD40

CD40 jest białkiem błonowym konstytutywnie przejawianym na limfocytach B i monocytach. Brak lub nieprawidłowe działanie CD40 powoduje brak możliwości przełączenia klas produkowanych immunoglobulin innych niż IgM.

Cel

Celem procedury jest ocena ekspresji CD40 na limfocytach B

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Badane parametry

- Ekspresja CD40 na limfocytach B

Wartości referencyjne

>90%

Ograniczenia metody

Brak zaburzeń ekspresji białka nie wyklucza defektów czynnościowych.

Uwagi

1. Opisano mutacje z prawidłową ekspresją wewnątrzkomórkową białka CD40 i resztkową powierzchniową

Ligand dla CD40 (CD40L=CD154)

Ekspresja ligandu dla CD40 przez aktywowane limfocyty T odgrywa zasadniczą rolę w odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Brak ekspresji CD154 jest przyczyną silnego upośledzenia prezentacji antygeny przez komórki dendrytyczne i makrofagi. Białko jest kodowane na chromosomie X. Ekspresja na aktywowanych limfocytach T CD4+ zachodzi w mechanizmie odmiennym niż to ma miejsce w przypadku stymulacji indukującej proliferację i produkcję cytokin.

Cel

Celem procedury jest ocena ekspresji ligandu dla CD40.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa pobrana na heparynę (litową lub sodową) 2,7 ml.

Wymagane jest równoczesne pobranie próbki kontrolnej od osoby zdrowej. Nie powinna to być mama dziecka, która może być nosicielką mutacji. Zaleca się pobranie próbki kontrolnej od mężczyzny, w miarę możliwości niespokrewnionego z pacjentem.

Badane parametry

- Badana jest ekspresja ligandu CD40L na powierzchni limfocytów T po stymulacji myrystynianem forbolu z jonomycyną.
- Miarą skuteczności stymulacji jest ekspresja CD69 na badanych limfocytach.

Wartości referencyjne

Ekspresja CD40L na aktywowanych limfocytach T CD8- >80%

Ekspresja CD69 na limfocytach T CD8- >95%

Ograniczenia metody

1. U pacjentów poniżej 6 mż ekspresja ligandu dla CD40 może nie być optymalna.
2. Niektóre warianty patogenne genu *CD40LG* nie wiążą się z zaburzeniami ekspresji białka.

Uwagi

1. Prawidłowa interpretacja wyniku badania wymaga wykorzystania przy każdym badaniu próbki od niespokrewnionej osoby zdrowej.
2. Nieprawidłowa ekspresja CD40L może być skutkiem nieprawidłowości w szlakach aktywacji komórek lub niedostatecznej ilości limfocytów T CD4+
3. Brak lub obniżona ekspresji ligandu dla CD40 nie związane z mutacją w *CD40LG* opisywane są m.in. u części pacjentów z pospolitym zmiennym niedoborem odporności, zaburzeniami aktywacji ścieżki NF-κB, mutacjami w *RFXAP*, *CD40*, *CD3G*, *Orai*, *IKZF3*, *PIK3CD*.
4. Niektóre leki, np. glikokortykosteroidy i cyklosporyna blokują prawidłową transkrypcję CD40L
5. Ze względu na złuszczenie się białka CD4 z powierzchni limfocytów T w okresie wczesnej aktywacji ocena ekspresji CD40L przeprowadzana jest na aktywowanych limfocytach T CD8-.
6. Badanie nie jest wykonywane dniach poprzedzających dzień wolny od pracy.

PTLD

Limfoproliferacja po przeszczepieniu narządu jest poważnym powikłaniem leczenia immunosupresyjnego, najczęściej indukowanym zakażeniem wirusem EBV. W większości przypadków ma charakter poliklonalny. Zakażenie wirusowe odbija się w różny sposób na subpopulacjach limfocytów T, przy czym reakcja może dodatkowo zależeć od rodzaju wirusa i fazy zakażenia. We wczesnej fazie zazwyczaj wiąże się z proliferacją limfocytów T CD8+. Zakażenie wirusem EBV powoduje zmiany w rozkładzie subpopulacji limfocytów B i może być przyczyną zmian w ekspresji łańcuchów lekkich immunoglobulin.

Zmiany w limfocytach B o charakterze rozrostu często wiążą się z zaburzeniami ekspresji molekuł CD10, CD23 i/lub CD5. Niezależnie od patomechanizmu, limfoproliferacja zazwyczaj wiąże się z aktywacją limfocytów i pojawieniem się aktywnych komórek efektorowych przejawiających ekspresję CD45RA.

Cel

Celem badania jest ocena odpowiedzi limfocytów T i B za zakażenie wirusowe u pacjenta leczonego immunosupresyjnie po przeszczepieniu narządu.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 2,7 ml (EDTA)

Badane parametry

- Rozkład odsetkowy populacji leukocytów (limfocyty/monocyty/komórki wielojądrzaste)
- Odsetek i liczba limfocytów w mm^3
 - T CD3+
 - T CD4+
 - T CD8+
 - T CD4+CD8+
 - CD4+:CD8+
 - B CD19+
 - NK CD16.56+CD3-
 - T o fenotypie NK CD16.56+CD3+
- Odsetek limfocytów T CD4+ i T CD8+ przejawiających ekspresję izoform CD45A i CD4RO
- Odsetek limfocytów przejawiających ekspresję CD10, CD23 i CD5.
- Odsetek limfocytów B przejawiających ekspresję łańcucha lekkiego kappa lub lambda
- Stosunek K: λ

Wartości referencyjne

Wskazane każdorazowo na wyniku

Ograniczenia metody

- Brak możliwości oceny czynnościowej
- W większości przypadków limfoproliferacja ograniczona jest do wtórnych tkanek limfatycznych i niemożliwa do wykrycia we krwi obwodowej.

Uwagi

1. Zaburzenia ekspresji łańcuchów lekkich zależą od rodzaju limfoproliferacji:
 - a. Limfoproliferacja polimorficzna

- i. brak ekspresji powierzchniowej łańcuchów lekkich
 - ii. ekspresja monoklonalna łańcuchów lekkich ($\kappa/\lambda > 4:1$ lub $<0.5:1$)
 - iii. ekspresja poliklonalna
 - b. Limfoproliferacja monomorficzna
 - i. brak ekspresji powierzchniowej łańcuchów lekkich
 - ii. ekspresja monoklonalna łańcuchów lekkich ($\kappa/\lambda > 4:1$ lub $<0.5:1$)
- 2. Ekspresja CD5, CD10, CD23
 - a. CD5 jest przejawiany na prawidłowych limfocytach T i na niewielkiej populacji limfocytów B, głównie populacji emigrantów ze szpiku.
 - i. wysoka ekspresja charakterystyczna jest dla limfocytów B przewlekłej białaczki limfocytarnej i chłoniaka z komórek płaszczka
 - ii. Brak ekspresji CD5 i CD10 charakteryzuje chłoniaki B strefy brzeżnej
 - b. Ekspresja CD10 zmienia się w trakcie rozwoju limfocytów B – fizjologicznie przejawiana jest na komórkach prekursorowych, a na obwodzie - na komórkach ośrodka rozmnażania.
 - i. Rozrost komórek B pochodzących ze wczesnych stadiów dojrzewania (białaczki i chłoniaki limfoblastyczne), a także pochodzących z ośrodka rozmnażania (chłoniaki grudkowe, pochodzące z dużych limfocytów B (DLBCL, chłoniaki Burkitta) wiąże się z ekspresją CD10.
 - c. CD23, receptor niskiego powinowactwa dla IgE, moduluje i przeciwdziała aktywacji limfocytów B zależnej od receptora BCR. Przejawiany jest na aktywowanych limfocytach B i części komórek B strefy płaszczka.
 - i. Ekspresja CD23 wykorzystywana jest do odróżnienia przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL) (CD23+) od chłoniaków z komórek płaszczka (CD23-)
- 3. Jednym ze sposobów leczenia limfoproliferacji limfocytów B jest stosowanie przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko CD20 przejawianemu na limfocytach B.
 - a. Skuteczność leczenia przeciwciałami monoklonalnymi anty-CD20 zależy od nasilenia ekspresji CD20 na proliferujących limfocytach B.
 - b. Monitorowanie efektywności eliminacji zmienionych limfocytów B można prowadzić za pomocą panelu mini (T/B/NK). Badania należy wykonywać przed podaniem kolejnej dawki.
 - c. Znaczny niedobór limfocytów B indukowany leczeniem może utrzymywać się przez długi okres po zakończeniu leczenia.

Węzeł chłonny – ocena rozrostu

Proces dojrzewania limfocytów B zależny od antygeny zachodzi w obwodowych tkankach limfatycznych. Na granicy pomiędzy strefą grudki a T-komórkową limfocyty B wchodzi w interakcję z limfocytami T pomocniczymi grudek chłonnych (TFH), subpopulacją profesjonalnych limfocytów T pomocniczych indukowanych przez komórki dendrytyczne. Dalszy proces różnicowania limfocytów B umożliwia powstawanie w mechanizmie pozagrudkowym krótkożyjących komórek plazmatycznych wydzielających IgM, a w grudce chłonnej - centroblastów i centrocytów warunkujących zróżnicowanie swoistości przeciwciał i ich selekcję. Poszczególne etapy dojrzewania komórek biorących udział w tym procesie różnią się ekspresją markerów powierzchniowych i/lub wewnątrzkomórkowych. Proces ten może ulegnąć zahamowaniu w dowolnym momencie, z dalszym rozrostem pojedynczego stadium rozwojowego.

Cel

Celem procedury jest ocena rozkładu stadiów rozwojowych limfocytów w węźle chłonny na podstawie oceny ich immunofenotypu.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Zawiesina komórek wytlukanych z węzła chłonnego

Badane parametry

- Rozkład odsetkowy:
 - Limfocytów T o fenotypie:
 - CD3+, sCD3+ CD3+TdT+, CD3+CD1a+, CD3+CD34+, CD2+CD7+, CD3+CD10+, CD3+CD33+, CD3+CD5+, CD3+CD7+, CD3+CD11b+, CD3+CD15+, CD3+CD43+, CD3+CD56+, CD3+CD57+, CD3+DR+, CD3+CD25+, TCRαβ/CD3+, TCRγδ/CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+,
 - Komórek NK: CD16.56+CD3-, CD56+, CD57+,
 - Limfocytów B przejawiających ekspresję:
 - Pan B: CD22+, CD79a+, CD19+, CD20+
 - markerów charakterystycznych dla limfocytów B w stadium rozwoju pro-B: CD34+/CD22+, TdT+/CD22+ oraz TdT+/CD79a+
 - markery charakterystycznych dla pre-B: TdT+/CD19+, CD34+/CD19+, CD10+/CD19+, cIgM+/CD19+,
 - markerów dojrzałych limfocytów B: sIgM+/CD19+, CD10-CD20+/CD19+
 - łańcuchów ciężkich immunoglobulin: IgD, IgM, IgA, IgG w populacji komórek CD27+ i CD27-
 - CD5, CD23 i CD30.

Wartości referencyjne

Wskazane każdorazowo na wyniku

Ograniczenia metody

1. Brak możliwości oceny dystrybucji badanych populacji w strefach anatomicznych węzła chłonnego. Wynik powinien być interpretowany w kontekście oceny histopatologicznej.

Uwagi

1. W warunkach prawidłowych w węźle chłonny rezydują limfocyty T i B na różnych stadiach rozwoju komórek niedojrzałych i dojrzałych, z zachowaniem proporcji między komórkami T i B w przybliżeniu 1:1. W badaniu można spodziewać się komórek odpowiadających fenotypowo niedojrzałym limfocytom B oraz aktywowanym postaciom limfocytów. W węźle chłonny nie powinny znajdować się komórki prekursorowe (tj. przejawiające ekspresję CD34 i/lub TdT). Nadreprezentacja komórek jednej linii lub obecność komórek prekursorowych świadczy o różnego rodzaju patologiiach.

Mieloperoksydaza (MPO)

Mieloperoksydaza jest białkiem o silnych właściwościach bakterioobójczych, uwalnianym w przebiegu reakcji zapalnych magazynowanym w ziarnistościach azurofilnych neutrofilów i lizosomach monocytów.

Cel

Celem procedury jest ocena obecności mieloperoksydazy zawartej w neutrofilach i monocytach krwi obwodowej.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA).

Badane parametry

Ekspresja mieloperoksydazy w neutrofilach i monocytach

Wartości referencyjne

Powyżej 75% wartości w próbce kontrolnej

Ograniczenia metody

1. Brak możliwości oceny czynnościowej
2. Zawartość MPO w neutrofilach noworodków jest znacznie niższa niż u dzieci powyżej 1 mż i u chłopców, niezależnie od wieku, dlatego w miarę możliwości należy odpowiednio dobierać próbki kontrolne.

Uwagi

1. Większość pacjentów z cMPO nie wykazuje objawów niedoboru. Niewielki odsetek pacjentów (ok. 5%) może cierpieć z powodu poważnych powikłań spowodowanych zakażeniami Candida.
2. Kompletny niedobór MPO może wiązać się z podobną reakcją w badaniu wybuchu tlenowego jak choroba ziarniniakowa (reakcja fałszywie dodatnia)

Wybuch tlenowy

Termin „wybuch tlenowy” (z ang. respiratory burst) oznacza nagłe uwolnienie reaktywnych form tlenu (anionów ponadtlenkowych i nadtlenu wodoru) przez komórkę, np. neutrofile i monocyty po kontakcie z różnego rodzaju patogenami. Pierwszym etapem procesu jest utworzenie aktywnego kompleksu oksydazy NADPH, którego składowe w stanie niepobudzonym komórki pozostają rozdzielone w różnych częściach komórki: w cytozolu, w błonach komórkowych oraz błonach ziarnistości wydzielniczych i specyficznych. W następstwie aktywacji oksydazy NADPH generowane są rodniki tlenowe, które utleniają dihydrorodaminę 123 (DHR 123) do rodaminę 123. Barwniki te emitują światło o różnej długości fali.

Cel

Celem procedury jest ocena aktywności oksydazy NADPH.

Metoda

Cytometria przepływowa. Badanie polega na ocenie różnicy fluorescencji pomiędzy komórkami niestymulowanymi a stymulowanymi i porównaniu wyniku uzyskanego dla badanego pacjenta do wyniku osoby zdrowej.

Materiał do badania

Krew obwodowa pobrana na heparynę 1,2 ml.

Wymagane jest równoczesne pobranie próbki kontrolnej od osoby zdrowej. Nie powinna to być mama dziecka, która może być nosicielką mutacji. zaleca się pobranie próbki kontrolnej od mężczyzny, w miarę możliwości niespokrewnionego z pacjentem.

Badane parametry

- Ocena odsetka i aktywności komórek pacjenta i komórek kontrolnych ulegających aktywacji pod wpływem aktywatora (myrystynian forbolu z jonomycyną)
- Porównanie wyników dla komórek badanych z wynikami dla komórek kontrolnych, tzw. Indeks.

Wartości referencyjne

Indeks komórek i fluorescencji powyżej 0,8

Ograniczenia metody

1. Aktywność oksydazy NADPH wymaga stymulacji komórki i zależy od zdolności utworzenia kompleksu, w skład którego wchodzi wszystkie składowe. Komórki niestymulowane nie generują rodników tlenowych.
2. Utlenianie dihydrorodaminy zależy od względnej i bezwzględnej liczby neutrofilów w próbce badanej, stężenia DHR i dostępności mieloperoksydazy.
3. Stosowany rutynowo do stymulacji aktywator – myrystynian forbolu z jonomycyną (PMA+I) nie pozwala na wykrycie defektu zależnego od wadliwego działania białka Rac2. Do badania nieprawidłowości w zakresie Rac2 wymagane jest badanie zdolności generowania rodników tlenowych pod wpływem aktywacji formilo-metionilo-leucylo-feniloalaniną (fMLP).

Uwagi

1. Badanie powinno być wykonane w ciągu 24, nie później jednak niż w ciągu 48 godzin od pobrania próbki. Wydłużenie czasu od pobrania do badania może skutkować powstaniem dwóch pików fluorescencji spowodowanych pojawieniem się populacji martwych neutrofilów o odmiennym profilu świecenia.
2. Dla prawidłowej interpretacji wyniku badania niezbędne jest równoczesne wykonanie badania w próbce pobranej w tym samym czasie od niespokrewnionej osoby zdrowej, transportowanej do laboratorium w tych samych warunkach co próbka badana.
3. Na zdolność generowania rodników tlenowych ma wpływ wiele czynników, zarówno uwarunkowanych genetycznie, jak również leki, niektóre składniki diety, niektóre zakażenia bakteryjne itd.

Perforyna

Perforyna, białko przejawiane w ziarnistościach cytotoksycznych limfocytów T CD8 (CTL) oraz w komórkach NK, odgrywa rolę w cytotoksyczności komórkowej. CTL biorą udział w eliminacji komórek zakażonych wirusami, odpowiedzi przeciwnowotworowej, odrzucaniu alloprzeszczepu oraz w chorobach autoimmunizacyjnych. Po rozpoznaniu komórki docelowej CTL uwalniają zawartość ziarnistości cytotoksycznych, w tym perforynę. W obecności wapnia perforyna tworzy wewnątrz błonowe kanały (pory) w błonie komórki docelowej, co prowadzi do śmierci komórki. Niedobór perforyny spowodowany mutacjami w genie *PRF1* lub jednym z genów odpowiedzialnych za dostarczenie perforyny z ziarnistości cytotoksycznych do synapsy immunologicznej (*UNC13D*, *STX11*, *STXBP2*) może być jedną z przyczyn rodzinnego zespołu hemofagocytarnego.

Cel

Celem procedury jest ocena obecności perforyny zawartej w limfocytach krwi obwodowej za pomocą cytometrii przepływowej.

Metoda

Cytometria przepływowa

Materiał do badania

Krew obwodowa - 1,2 ml (EDTA)

Wymagane jest równoczesne badanie próbki kontrolnej od osoby zdrowej.

Badane parametry

- Ekspresja perforyny w komórkach NK oraz limfocytach T CD8+ i T CD4+

Wartości referencyjne

Powyżej 80% w komórkach NK

Ograniczenia metody

1. Brak możliwości oceny czynnościowej
2. Wykorzystywane diagnostycznie przeciwciało nie wykrywa syntezy perforyny *de novo*
3. Brak zaburzeń ekspresji nie wyklucza defektów czynnościowych białka.

Uwagi

1. Do wykrywania ekspresji perforyny rutynowo wykorzystuje się przeciwciało monoklonalne $\delta G9$ wykrywające perforynę obecną w środowisku kwaśnym ziarnistości cytotoksycznych. Klon B-D48 rozpoznaje zarówno perforynę obecną w ziarnistościach jak i syntetyzowaną *de novo*. W badaniach diagnostycznych powszechnie wykorzystywany jest klon $\delta G9$, natomiast klon B-D48 wykorzystywany jest tylko w testach stymulacji *in vitro*.
2. Zawartość perforyny w komórkach NK zależy od ich stopnia dojrzałości – najmniej jest w komórkach dojrzewających CD56^{bright}, najwięcej w komórkach w CD56^{dim} uważanych za ostatecznie zróżnicowane. Wg danych literaturowych do wykrycia defektu niezbędny jest całkowity brak ekspresji białka.
3. W aktywnych zakażeniach wirusowych rośnie ekspresja perforyny w komórkach NK i limfocytach T CD8+. Jej poziom stabilizuje się lub maleje w komórkach zakażonych przewlekle.
4. Całkowity niedobór perforyny jest przyczyną rodzinnie występującego zespołu hemofagocytarnego typu 2 (FHL-2). Mutacje hipomorficzne w genie *PRF1* mają związek z atypowymi/późnymi postaciami rodzinnych zespołów hemofagocytarnych, chłoniakami i innymi postaciami nowotworów.