Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Lek. Nel Dąbrowska-Leonik

Przebieg kliniczny różnych postaci ciężkiego złożonego niedoboru odporności

Promotor: dr hab. n. med. Małgorzata Pac

Klinika Immunologii
Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”
Kierownik dr hab. n. med. Małgorzata Pac

Warszawa 2026

Bardzo dziękuję:

Pani dr hab. Małgorzacie Pac
za opiekę naukową, poświęcony mi czas, życzliwość i wsparcie na każdym etapie powstania poszczególnych artykułów oraz pracy doktorskiej.

Pani Profesor Ewie Bernatowskiej
za inspirację i wiarę w moje możliwości.

Wszystkim współautorom publikacji oraz koleżankom z Kliniki Immunologii, Pracowni Zgodności Tkankowej, Zakładu Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej
za współpracę i wkład w tworzeniu poszczególnych publikacji.

Pacjentom i ich Rodzicom
za cierpliwość i zgodę na wykorzystanie danych klinicznych do powstania prac.

Szczególne podziękowania mojemu Mężowi i Rodzinie
za wspieranie mnie w trakcie przygotowywania pracy.

Spis treści

I.	STRESZCZENIE W JEZYKU POLSKIM ……...	4
II.	STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM ……	11
III.	SŁOWA KLUCZOWE W JĘZYKU POLSKIM I ANGIELSKIM …….	17
IV.	WYKAZ SKRÓTÓW ……...	18
V.	WSTĘP ……..	21
VI.	CELE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ ……	25
VII.	WYKAZ PUBLIKACJI: ……...	26
	- PRACE O CHARAKTERZE ARTYKUŁÓW ORYGINALNYCH ……..	26
	- PRACE O CHARAKTERZE OPISÓW PRZYPADKÓW …….	28
VIII.	MATERIAŁ I METODY …….……..……...	29
IX.	WYNIKI I DYSKUSJA ARTYKUŁÓW WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAW ……	33
	1. WYNIKI I DYSKUSJA PUBLIKACJI NUMER 1 ……..	33
	2. WYNIKI I DYSKUSJAE PUBLIKACJI NUMER 2 …….……...	39
	3. WYNIKI I DYSKUSJA PUBLIKACJI NUMER 3 ……..	44
	4. WYNIKI I DYSKUSJA PUBLIKACJI NUMER 4 ……..	47
	5. OPIS PRZYPADKU I DYSKUSJA PUBLIKACJI NUMER 5…..……....	54
	6. OPIS PRZYPADKU I DYSKUSJA PUBLIKACJI NUMER 6 ……	59
X.	PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI ...……...…….	64
XI.	WYKAZ TABEL I RYCIN ……...……...	66
XII.	PIŚMIENNICTWO ……...……	86
XIII.	KOPIE OPUBLIKOWANYCH PRAC ……..……...	98
XIV.	OŚWIADCZENIA WSPOŁAUTORÓW ……..……...	159
XV.	ZGODY KOMISJI BIOETYCZNEJ …….	183

I. Streszczenie w języku polskim

Ciężki złożony niedobór odporności (severe combined immunodeficiency - SCID) jest wrodzonym błędem odporności, wynikającym z zaburzeń dojrzewania i różnicowania limfocytów T z macierzystych komórek krwiotwórczych szpiku. W niektórych genotypach zaburzenie dojrzewania dotyczy również limfocytów B i/lub komórek NK. Częstość występowania choroby określana na podstawie badań przesiewowych noworodków, różni się w poszczególnych krajach i wynosi: w Niemczech 1:54 000, w USA 1:58 000 - 1:66 000, w Izraelu 1:29 000. W krajach z dużym odsetkiem małżeństw spokrewnionych częstość jest wyższa, np.: w Arabii Saudyjskiej 1:2 906, a w Omanie 1:22 000 [1-6].

Diagnoza SCID stawiana jest na podstawie badań immunologicznych (ilościowa ocena subpopulacji limfocytów T, B, NK metodą cytometrii przepływowej, ocena czynnościowa limfocytów w teście transformacji blastycznej, stężenia immunoglobulin) oraz molekularnych z oceną wariantów genetycznych. W zależności od objawów klinicznych i wyników badań wyróżnia się postać typową, atypową (zwykle o łagodniejszym przebiegu) oraz zespół Omenna [7]. Za najczęstszą przyczynę SCID uważa się warianty patogenne w genach *IL2RG, RAG1/2, ADA, IL7R, DCLRE1C, JAK3*; stanowią one ponad 80% genotypów SCID w USA [7] i ponad 70% w Niemczech [2].

Choroba nieleczona prowadzi do zgonu w pierwszych latach życia, głównie z powodu zakażeń, w tym oportunistycznych. Leczeniem docelowym jest przede wszystkim przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych (hematopoietic stem cells transplantation, HSCT). Terapie genowe są możliwe w Europie dla wariantów patogennych dotyczących niektórych genów - *ADA, IL2RG, RAG1, DCLRE1C*. Pozytywną opinię i rejestrację Europejskiej Agencji Leków (EMA – European Medical Agency) uzyskał jedynie preparat Strimvelis stosowany w leczeniu ADA-SCID. Terapia genowa w innych postaciach SCID prowadzona jest w chwili obecnej w ramach badań klinicznych. W niektórych wariantach SCID możliwa jest enzymatyczna terapia zastępcza (ETZ) jako leczenie pomostowe do czasu HSCT. W zespole Omenna przed leczeniem docelowym stosuje się terapię immunosupresyjną.

Szczególną grupę stanowią pacjenci z ADA-SCID. Choroba jest wrodzonym zaburzeniem metabolizmu puryn, a objawy wynikają z gromadzenia w komórkach toksycznej dezoksyadenozyny, substratu brakującego enzymu ADA i dotyczą nie tylko szpiku, prowadząc do ciężkiego złożonego niedoboru odporności, ale również innych narządów: mózgu, płuc, wątroby, układu kostnego. W leczeniu stosuje się przeszczepienie

macierzystych komórek krwiotwórczych, jak również enzymatyczną terapię zastępczą oraz terapię genową [8].

Wczesne rozpoznanie SCID zwiększa szanse na skuteczne leczenie. Przeżycie niemowląt poddanych procedurze HSCT przed ukończeniem 3,5 miesięcy życia oraz przed wystąpieniem powikłań infekcyjnych wynosi 94%, a u starszych niemowląt z towarzyszącymi zakażeniami obniża się do 17-82% [9-10]. W niektórych krajach prowadzone są przesiewowe badania noworodków w celu wykrycia pacjentów ze SCID przed pojawieniem się zakażeń. Pozwala to na wcześniejszą i skuteczniejszą diagnostykę i leczenie. W Polsce powszechnego przesiewowe badania noworodków w kierunku SCID są prowadzone od września 2025 r. Wcześniej szybka diagnoza mogła być postawiona jedynie u rodzeństwa dzieci z rozpoznanym SCID. Ważne jest rozpowszechnianie wiedzy na temat objawów SCID oraz wczesna identyfikacja chorych.

Zasadniczym celem pracy jest charakterystyka kliniczna i laboratoryjna, w tym immunogenetyczna pacjentów z różnymi postaciami SCID, zdiagnozowanych w Oddziale Immunologii Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka" (IPCZD). Rozprawę stanowi cykl sześciu publikacji: czterech o charakterze artykułów oryginalnych oraz dwóch opisów przypadków, w których uwzględniono cele szczegółowe jak poniżej.

W publikacji pt. "What pediatrician should know about different types of severe combined immunodeficiency – a single center experience. Co pediatra powinien wiedzieć o różnych postaciach ciężkiego złożonego niedoboru odporności – doświadczenia jednego ośrodka" celem była charakterystyka kliniczna i laboratoryjna, w tym immunogenetyczna pacjentów z rozpoznaniem typowego, atypowego SCID i zespołu Omenna zdiagnozowanych w Oddziale Immunologii IPCZD.

W publikacji pt. „National experience with adenosine deaminase deficiency related SCID in Polish children" celem była charakterystyka kliniczna, laboratoryjna i immunogenetyczna pacjentów z rozpoznaniem ADA-SCID oraz ocena efektów enzymatycznej terapii zastępczej (ETZ) rekombinowaną pegylowaną deaminazą adenozyny w tej grupie dzieci.

W trzeciej publikacji pt. "BCG Moreau vaccine safety profile and NK cells-double protection against disseminated BCG infection in retrospective study of BCG vaccination in 52 Polish children with severe combined immunodeficiency" celem była ocena częstości występowania niepożądanego odczynu poszczepiennego po podaniu żywej szczepionki BCG Moreau u pacjentów ze SCID w Polsce.

W czwartej publikacji pt. “The clinical and genetic spectrum of 82 patients with RAG deficiency including a c.256_257delAA founder variant in Slavic countries” celem pracy było oszacowanie częstości występowania, opisanie obrazu klinicznego, zmienności genetycznej z uwzględnieniem rozmieszczenia geograficznego pacjentów z rozpoznaniem SCID wywołanym wariantami w genach *RAG* w populacjach zamieszkujących kraje słowiańskie.
Celem publikacji piątej pt. “Case report: severe combined immunodeficiency with ligase 1 deficiency and Omenn-like manifestation” oraz publikacji szóstej pt. “Atypical Hemolytic Uremic Syndrome (aHUS) and Adenosine Deaminase (ADA)-Deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-Two Diseases That Exacerbate Each Other: Case Report” było przedstawienie unikatowych przebiegów choroby dwóch pacjentów z rozpoznaniem SCID.

Wyniki

W publikacji pt. “What pediatrician should know about different types of severe combined immunodeficiency – a single center experience. Co pediatra powinien wiedzieć o różnych postaciach ciężkiego złożonego niedoboru odporności – doświadczenia jednego ośrodka” wykazano, że mediana wieku w chwili diagnozy SCID wyniosła 4,4 miesiąca i była wyższa w przypadku AS (8 miesięcy, $p<0,05$). Mediana opóźnienia diagnozy (diagnostic delay - DD) wyniosła 2,5 miesiąca (4,7 miesiąca u dzieci z AS). Podejrzenie choroby wysuwali najczęściej pediatrzy (u 44,4% wszystkich dzieci), a w następnej kolejności hematolodzy (19,4% wszystkich dzieci, 26,3% dzieci z AS, z DD 20 miesięcy) lub dermatolodzy. Pierwszymi objawami były infekcje (64%), wysypka (22,2%), przewlekła biegunka (5,6%), anemia (5,6%) i limfopenia (2,8%). W momencie rozpoznania u 79,5% pacjentów występowała limfopenia. Mediana odsetka limfocytów T wczesnych emigrantów grasicy (recent thymic emigrants - RTE) wynosiła odpowiednio 0,2%, 2,1%, 0,3% w TS, AS i OS. Najczęstsze warianty patogenne znaleziono w następujących genach: *IL2RG* (23,8%), *RAG1/2* (16,6%), *JAK3* (14,3%), *ADA* (11,9%) i *IL7RA* (4,8%). Przeżycie wyniosło 69% u wszystkich dzieci.

W publikacji pt. „National experience with adenosine deaminase deficiency related SCID in Polish children” rozpoznanie ADA-SCID było postawione pomiędzy 7 tygodni a do 27 miesięcy życia. W momencie podejrzenia rozpoznania SCID wszyscy pacjenci prezentowali leukopenię z neutropenią i limfopenią. Wśród objawów pozaszpikowych obserwowano: wzmożoną aktywność transaminaz (5 pacjentów), dysplazje szkieletowe (2 pacjentów),

zmiany zanikowe ośrodkowego układu nerwowego (1 pacjent), atypowy zespół hemolityczno-mocznicowy (1 pacjent), U wszystkich pacjentów liczba limfocytów T, limfocytów B i komórek NK była poniżej wartości referencyjnych dla wieku. Stężenie immunoglobulin klasy G było obniżone u 2 pacjentów, a klasy IgM u 3 pacjentów. Diagnoza ADA-SCID była stwierdzona na podstawie aktywności ADA w erytrocytach (4 pacjentów) i/lub badania genetycznego (warianty patogenne stwierdzono u 6 pacjentów). Procedurze HSCT było poddanych 6 pacjentów, wszyscy ci pacjenci żyją, 1 pacjent zmarł przed kwalifikacją do HSCT. U 4 pacjentów Oddziału Immunologii IPCZD przed HSCT stosowano ETZ obserwując pozytywny efekt: normalizację liczby limfocytów oraz aktywności transaminaz. Żaden z pacjentów nie był poddany terapii genowej.

W publikacji pt. "BCG Moreau vaccine safety profile and NK cells-double protection against disseminated BCG infection in retrospective study of BCG vaccination in 52 Polish children with severe combined immunodeficiency" wykazano, że w latach 1980-2015 rozsiane zakażenie BCG obserwowano u 19% dzieci z SCID szczepionych szczepionką BCG Moreau. Odsetek rozsianych powikłań w grupie polskich dzieci był niższy w porównaniu z innymi krajami na świecie i według Marciano wynosił 34% (p=0,0028) [11]. Rozsiane zakażenie BCG obserwowano jedynie u pacjentów z niską liczbą komórek NK (p=0,0161). Liczba komórek NK nie wpływała na wystąpienie miejscowego niepożądanego odczynu szczepionkowego.

W publikacji pt. "The clinical and genetic spectrum of 82 patients with RAG deficiency including a c.256_257delAA founder variant in Slavic countries" wśród 82 pacjentów z defektem RAG stwierdzono następujące fenotypy SCID: typowe (n = 20), atypowe (n = 21), zespół Omenna (n = 37) oraz CID (n=4). Sześćdziesięciu siedmiu (81,7%) pacjentów było nosicielami *RAG1*, a 15 pacjentów (18,3%) miało bialleliczne warianty *RAG2*. Oszacowano, że minimalna roczna częstość występowania niedoboru RAG w krajach słowiańskich waha się od 1 na 180 000 do 1 na 300 000 żywych urodzeń. W kohorcie pacjentów z wariantami *RAG1* 70% (n = 47) było nosicielami allelu c.256_257delAA w układzie homozygotycznym (n = 18, 27%) lub heterozygoty złożonej (n = 29, 43%). Większość (77%) pacjentów z homozygotycznym wariantem *RAG1* c.256_257delAA pochodziła z dorzecza Wisły w środkowo-wschodniej Polsce, a przypadki złożonej heterozygoty występowały we wszystkich krajach słowiańskich z wyjątkiem Bułgarii. Obraz kliniczny i immunologiczny pacjentów z wariantem homozygotycznym c.256_257delAA genu *RAG1* był bardzo zróżnicowany (SCID typowy, atypowy, zespół Omenna).

W publikacji pt. „Case report: severe combined immunodeficiency with ligase DNA I deficiency and Omenn-like manifestation" przedstawiono dziecko ze SCID o typie zespołu Omenna oraz z niedokrwistością makrocytarną, u którego rozpoznano deficyt ligazy DNA I. Ciężka niedokrwistość makrocytarna oraz limfopenia krwi obwodowej i szpiku skłoniła do szybkiej diagnostyki w kierunku wrodzonych błędów odporności. W wieku 8 tygodni rozpoznano SCID o typie zespołu Omenna. Diagnostyka genetyczna wykazała obecność dwóch nowych, dotychczas nieopisanych wariantów w genie *LIG1* (NM_000234.1): wariantu missense (c.2312 G>A, p.Arg771Gly) oraz wariantu splicingowego (c.776+5G>T, p.Pro260*), a ekspozycja fibroblastów na promieniowanie gamma wykazała zwiększoną radiowrażliwość. W wieku 4 miesięcy przeprowadzono HSCT od zgodnego dawcy niespokrewnionego według protokołu dla pacjentów z radiowrażliwością.

W publikacji "Atypical Hemolytic Uremic Syndrome (aHUS) and Adenosine Deaminase (ADA)-Deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-Two Diseases That Exacerbate Each Other: Case Report" opisano pacjenta z nietypowym przebiegiem ADA-SCID pod postacią dominujących objawów nefrologicznych. W pierwszych miesiącach rozpoznano atypowy zespół hemolityczno-mocznicowy, niewydolność nerek. Podejrzenie ADA-SCID zostało postawione dopiero w okresie schyłkowej niewydolności wielonarządowej, a potwierdzone *post mortem*. Przebieg choroby tego pacjenta jest potwierdzeniem, że niezdiagnozowany i nieleczony ADA-SCID prowadzi do ogólnoustrojowej manifestacji i zgonu.

Podsumowanie

Tematem pracy doktorskiej jest diagnostyka i leczenie pacjentów z ciężkim złożonym niedoborem odporności zdiagnozowanych w Klinice Immunologii IP CZD. Zagadnienia te zostały przedstawione we wszystkich pracach. W publikacji nr 2 uwzględniono dodatkowo dwóch polskich pacjentów spoza IPCZD, a w publikacji nr 4 także pacjentów z innych krajów słowiańskich.

Objawami skłaniającymi do wysunięcia podejrzenia SCID i skierowania do diagnostyki immunologicznej były u większości pacjentów zakażenia – ciężkie, zagrażające życiu, nawracające, oportunistyczne lub powikłania po szczepieniu żywymi atenuowanymi szczepionkami (rozsiane zakażenie prątkiem BCG). Większość pacjentów (80%) prezentowała limfopenię, która powinna być już wcześniej przyczyną prowadzenia diagnostyki w kierunku SCID. Rozpoznanie SCID postawiono znacznie później w przypadku

AS niż TS i OS. Rodzaj pierwszych objawów nie różnił się między poszczególnymi typami SCID. W publikacji nr 1 i nr 2 stwierdzono, że rozpoznanie SCID i ADA-SCID jest stawiane u coraz młodszych pacjentów. W ADA-SCID może to wynikać z toksycznego działania metabolitów na komórki limfoidalne i mieloidalne prowadzącego do leukopenii, neutropenii i limfopenii, co zwraca uwagę pediatrów i pozwala wysunąć podejrzenie niedoboru odporności. Izolowana limfopenia bez leukopenii i neutropenii u pacjentów z innymi postaciami SCID bywa przeoczana.

Najdłuższe opóźnienie diagnozy mieli pacjenci z atypową postacią SCID, pomimo stwierdzanej wcześniej limfopenii. Dlatego u niemowląt z limfopenią zaleca się poszerzenie diagnostyki w kierunku SCID. Dodatkowym argumentem są nieprawidłowości w badaniu radiologicznym klatki piersiowej aplazja/hipoplazja grasicy lub zmiany dysplastyczne kości, mogące wskazywać na ADA-SCID.

Ciężkim powikłaniem SCID może być rozsiane zakażenie prątkiem szczepionkowym BCG, które dotyczy blisko 20% pacjentów ze SCID szczepionych w Polsce, co przedstawiono w publikacji nr 3. Podszczep Moreau BCG produkowany w Polsce przez firmę Biomed pochodzi od macierzystego podszczepu *Mycobacterium bovis BCG Moreau Rio de Janeiro*, jednak jest bezpieczniejszy niż w populacji brazylijskiej (48% pacjentów SCID szczepionych BCG miało zakażenie rozsiane) lub w innych populacjach światowych (34%).

Diagnostyka genetyczna wykazała, że najczęstszymi genotypami SCID pacjentów diagnozowanych przez Oddział Immunologii IPCZD w latach 2010-2023 były *IL2RG, RAG 1/2, JAK3* i *ADA*.

W genie *RAG1* u naszych pacjentów dominuje wariant c.256_257delAA w układzie homozygotycznym. Wysoki odsetek tego wariantu wśród dzieci pochodzących ze wschodniej Polski oraz obecność u wszystkich Słowian może wskazywać, że jest to wariant założycielski, który pochodzi z dorzecza Wisły w Polsce co przedstawiono w publikacji nr 4.

Leczeniem przyczynowym pacjentów ze SCID jest HSCT, ale część pacjentów z ciężkimi zakażeniami lub niewydolnością wielonarządową umiera w trakcie diagnozy, lub w okresie okołoprzeszczepowym.

Przeżycie pacjentów ze SCID diagnozowanych przez Oddział Immunologii IPCZD w latach 2010-2023 u pacjentów z obciążonym wywiadem rodzinnym, zdiagnozowanych w pierwszych dniach i leczonych HSCT w pierwszych miesiącach życia wynosiło powyżej 80%. U pacjentów, u których rozpoznanie postawiono po pojawieniu się objawów przeżycie wynosiło 68% (26/38), w tym 78% (26/34) u poddanych HSCT (4 pacjentów zmarło przed HSCT) – publikacja nr 1.

ETZ była efektywna u wszystkich czterech leczonych pacjentów z ADA-SCID. Żaden z pacjentów nie był poddany terapii genowej, na co wpłynął ograniczony dostęp do procedury (w kilku ośrodkach w Europie), brak zgody rodziców, oraz zgodnie z piśmiennictwem, dłuższy czas leczenia i rekonstytucji układu immunologicznego w ramach terapii genowej w porównaniu do procedury HSCT.

SCID jest w populacji europejskiej chorobą ultrarzadką, ponadto niektórzy pacjenci mają wyjątkową manifestację objawów, co przedstawiono w dwóch opisach przypadków. W publikacji nr 5 przedstawiono dziecko ze SCID o typie zespołu Omenna, z towarzyszącą ciężką wrodzoną niedokrwistością makrocytarną. Diagnostyka molekularna wykazała, że przyczyną objawów jest deficyt ligazy 1. Jest to niezwykle rzadka choroba, dotychczas opisano na świecie 7 pacjentów z deficytem ligazy 1, o zróżnicowanym spektrum objawów immunologicznych. U trojga (w tym u naszej pacjentki) przeprowadzono HSCT. Wczesna diagnoza u tej pacjentki wynikała z obecności ciężkiej niedokrwistości makrocytarnej wymagającej licznych transfuzji uzupełniających koncentratu krwinek czerwonych i skierowania pacjentki do hematologa, który zwrócił uwagę na towarzyszącą limfopenię. W publikacji nr 6 opisano pacjenta z nietypowym przebiegiem ADA-SCID pod postacią dominujących objawów nefrologicznych: w pierwszych miesiącach rozpoznano atypowy zespół hemolityczno-mocznicowy, niewydolność nerek, podejrzenie ADA-SCID zostało postawione dopiero w okresie schyłkowej niewydolności wielonarządowej.

Przedstawiona w powyższych pracach charakterystyka objawów klinicznych i wyników badań pacjentów może pozwolić na poprawę diagnostyki SCID, zanim dojdzie do powikłań narządowych i dzięki temu na zwiększenie przeżywalności tych pacjentów.

II. Streszczenie w języku angielskim

Severe combined immunodeficiency (SCID) is an inborn error of immunity resulting from impaired maturation and differentiation of T lymphocytes from hematopoietic stem cells in the bone marrow. In some genotypes, the impaired maturation also affects B lymphocytes and/or NK cells. The incidence of the disease, determined based on newborn screening tests, varies between countries and is: in Germany 1:54,000, in the USA 1:58,000-1:66,000, in Israel 1:29,000. In countries with a high percentage of consanguineous marriages, the incidence is higher, e.g., in Saudi Arabia 1:2,906, and in Oman 1:22,000 [1-6].

SCID is diagnosed based on immunological tests (quantitative assessment of T, B, NK lymphocyte subpopulations using flow cytometry, functional lymphoproliferative response) and molecular with the assessment of genetic variants. Depending on the clinical symptoms and test results, the disease can be classified as typical, atypical (usually with a milder course), or Omenn syndrome [7]. Genes with pathogenic variants most commonly causing SCID include *IL2RG*, *RAG1/2*, *ADA*, *IL7R*, *DCLRE1C*, and *JAK3*; these constitute over 80% of SCID genotypes in the USA [7] and over 70% in Germany [2].

Untreated, the disease leads to death in the first years of life, primarily due to infections, including opportunistic ones. The primary treatment option is hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Gene therapies are available in Europe to address pathogenic changes in certain genes: *ADA*, *IL2RG*, *RAG1*, and *DCLRE1C*. However, only Strimvelis has received a positive opinion from the European Medicines Agency for the treatment of ADA-SCID. Enzyme replacement therapy (ERT) is available for patients with adenosine deaminase deficiency (ADA-SCID). In Omenn syndrome, immunosuppressive therapy is used prior to targeted therapy.

Patients with ADA-SCID are a special group. The disease is an inherited disorder of purine metabolism, and symptoms result from the accumulation of toxic deoxyadenosine, a substrate of the missing ADA enzyme, in cells. They affect not only the bone marrow, leading to severe combined immunodeficiency, but also other organs: the brain, lungs, liver, and skeletal system. ADA-SCID has a prevalence of 1 in 200,000–1 in 1 million births and accounts for approximately 10–20% of all SCID patients. Treatment includes hematopoietic stem cell transplantation, enzyme replacement therapy, and gene therapy [8].

Early diagnosis of SCID increases the chances of successful treatment. The survival rate for infants undergoing HSCT before the age of 3.5 months and before infectious complications occurs is 94%, while in older infants with concomitant infections, this rate decreased to 17-

82% [9-10]. In some countries, newborn screening helps to detect patients with SCID before infections develop. In Poland newborn screening for SCID is available from September 2025. Previously diagnosis could only be made in siblings of children diagnosed with SCID. It is important to increase awareness of the symptoms of SCID and to identify patients early.

The primary aim of this work is to characterize the clinical and laboratory factors, including immunogenetic characteristics, of patients with various types of SCID diagnosed at the Immunology Department of the Children's Memorial Health Institute (CMHI). The dissertation comprises a series of six publications, four original articles and two case reports, which address the specific objectives outlined below.

The first publication, titled "What a pediatrician should know about different types of severe combined immunodeficiency – a single-center experience," aims to characterize the clinical symptoms and laboratory results, including immunogenetic, of patients diagnosed with typical, atypical SCID, and Omenn syndrome at the Immunology Department CMHI.

In the second publication, entitled "National experience with adenosine deaminase deficiency related SCID in Polish children", the aim was to characterize clinical, laboratory and immunogenetic characteristics of patients diagnosed with ADA-SCID and to evaluate the effects of ERT treatment of children with ADA-SCID at the Immunology Department CMHI.

In the third publication, titled "BCG Moreau vaccine safety profile and NK cells—double protection against disseminated BCG infection in a retrospective study of BCG vaccination in 52 Polish children with severe combined immunodeficiency," the aim was to assess the incidence of adverse reactions following administration of the live BCG Moreau vaccine in patients with SCID in Poland.

The aim of the fourth publication, "The clinical and genetic spectrum of 82 patients with RAG deficiency, including a c.256_257delAA founder variant in Slavic countries," was to estimate the prevalence, present clinical outcome, and genetic variability of patients diagnosed with SCID caused by variants in *RAG* genes in populations living in Slavic countries.

The aim of the fifth publication, "Case report: severe combined immunodeficiency with ligase 1 deficiency and Omenn-like manifestation," and the sixth publication, "Atypical Hemolytic Uremic Syndrome (aHUS) and Adenosine Deaminase (ADA)-Deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-Two Diseases That Exacerbate Each Other: Case Report," was to present the unique disease courses of two patients diagnosed with SCID.

Results

In the publication "What pediatricians should know about different types of severe combined immunodeficiency – a single center experience," the median age at diagnosis of SCID was 4.4 months, higher in AS (8 months, $p<0.05$). The median diagnostic delay (DD) was 2.5 months (4.7 months in children with AS). The disease was suspected by pediatricians (in 44.4% of all children), hematologists (19.4% of all children, 26.3% of children with AS, DD - 20 months), or dermatologists. The initial symptoms were infections (64%), rash (22.2%), chronic diarrhea (5.6%), anemia (5.6%), and lymphopenia (2.8%). Lymphopenia was present in 79.5% of patients at diagnosis. Median recent thymic emigrants (RTE) were 0.2%, 2.1%, and 0.3% in TS, AS, and OS, respectively. The most common pathogenic variants were found in the following genes: *IL2RG* (23.8%), *RAG1/2* (16.6%), *JAK3* (14.3%), *ADA* (11.9%), and *IL7RA* (4.8%). Survival was 69% in all children.

In the publication "National experience with adenosine deaminase deficiency related SCID in Polish children," the diagnosis of ADA-SCID was made between 7 weeks and 27 months of age, in the first three patients between 16 and 27 months of age, and in the last four between 7 weeks and 6 months of age. At the time of suspected SCID diagnosis, all patients had leukopenia with neutropenia and lymphopenia. Extramedullary manifestations included: elevated transaminase activity (5 patients), skeletal dysplasia (2 patients), atrophy in the central nervous system (1 patient), and atypical hemolytic-uremic syndrome (1 patient). In all patients, the counts of T lymphocytes (both CD4+ and CD8+), B lymphocytes, and NK cells were below age-appropriate reference values. The concentration of immunoglobulin G was decreased in two patients, and IgM in three patients. The diagnosis of ADA-SCID was made based on ADA activity in red blood cells (4 patients) and/or genetic testing (pathogenic variants were identified in 6 patients). Six patients underwent HSCT; all are alive; one patient died before qualifying for HSCT. Four patients in the Immunology Department CMHI received ERT prior to HSCT, and normalization of lymphocyte counts and transaminase activity was observed. None of the patients underwent gene therapy.

The publication "BCG Moreau vaccine safety profile and NK cells—double protection against disseminated BCG infection in a retrospective study of BCG vaccination in 52 Polish children with severe combined immunodeficiency" demonstrated that disseminated BCG infection occurs in 19% of children with SCID vaccinated in Poland, a rate lower than in other global populations (34% in Marciano's study ($p=0.0028$) [11]. Disseminated BCG infection was observed only in patients with low NK cell counts ($p=0.0161$). NK cell counts did not influence the occurrence of local adverse reactions to the vaccine.

In the publication “The clinical and genetic spectrum of 82 patients with RAG deficiency including a c.256_257delAA founder variant in Slavic countries,” a group of 82 patients with RAG deficiency demonstrated typical (n = 20), atypical (n = 21), Omenn syndrome (n = 37) SCID phenotypes and CID (n=4). Sixty-seven (81.7%) patients were *RAG1* carriers, and 15 patients (18.3%) had biallelic *RAG2* variants. We estimate that the minimum annual incidence of RAG deficiency in Slavic countries ranges from 1 in 180,000 to 1 in 300,000 live births. In the cohort of patients with *RAG1* variants, 70% (n = 47) carried the c.256_257delAA allele in a homozygous (n = 18, 27%) or compound heterozygous (n = 29, 43%). The majority (77%) of patients with the homozygous *RAG1* c.256_257delAA variant originated from the Vistula River basin in central-eastern Poland, and cases of compound heterozygote occurred in all Slavic countries except Bulgaria. The clinical and immunological course of patients with the homozygous c.256_257delAA variant of the *RAG1* gene was very diverse (typical SCID, atypical SCID, Omenn syndrome).

The publication "Case report: severe combined immunodeficiency with ligase 1 deficiency and Omenn-like manifestation" presents a child with Omenn-like SCID and macrocytic anemia, who was diagnosed with ligase DNA I deficiency. Severe macrocytic anemia and lymphopenia in peripheral blood and bone marrow prompted rapid diagnostic workup for inborn errors of immunity. At 8 weeks of age, SCID of the Omenn syndrome type was diagnosed. Genetic testing revealed the presence of two new variants in the *LIG1* gene, and exposure of fibroblasts to gamma radiation revealed increased radiosensitivity. At 4 months of age, HSCT was performed from a matched unrelated donor according to the protocol for radiosensitive patients. The publication "Atypical Hemolytic Uremic Syndrome (aHUS) and Adenosine Deaminase (ADA)-Deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-Two Diseases That Exacerbate Each Other: Case Report" describes a patient with an atypical course of ADA-SCID characterized by predominant renal symptoms. Within the first few months, atypical hemolytic uremic syndrome and renal failure were diagnosed. ADA-SCID was suspected only after end-stage multiple organ failure and confirmed *post mortem*.

Summary

The topic of this dissertation is the diagnosis and treatment of patients with severe combined immunodeficiency diagnosed in the Immunology Department CMHI, and these issues are presented in all papers. Paper 2 also included two Polish patients from outside the IPCZD, and Paper 4 also included patients from other Slavic countries.

In most patients, the symptoms causing the suspicion of SCID and referral for immunological diagnostics were infections – severe, life-threatening, recurrent, opportunistic, or disseminated BCG infection. Most patients (80%) had lymphopenia at that time, which should have been a reason for prior investigation of SCID. The diagnosis of SCID was made significantly later in cases of AS than in TS and OS. The type of first symptoms does not differ between the different types of SCID.

Publications No. 1 and No. 2 found that the diagnosis of SCID and ADA-SCID is being made in increasingly younger patients. Early diagnosis in ADA-SCID patients may result from the presence of leukopenia (with neutropenia and lymphopenia), which alerted pediatricians and allowed for the suspicion of immunodeficiency. Isolated lymphopenia without leukopenia and neutropenia in patients with other forms of SCID can be overlooked. The longest delay in diagnosis was seen in patients with atypical SCID, all of whom had lymphopenia. Therefore, evaluation for SCID is recommended in infants with lymphopenia, especially if chest radiography shows thymic aplasia/hypoplasia or dysplastic bone changes that may indicate ADA-SCID (acute scapular angle).

A serious complication of SCID can be disseminated BCG infection, which affects nearly 20% of SCID patients vaccinated in Poland, as presented in publication no. 3. The Moreau BCG substrain produced in Poland by Biomed is derived from the parent *Mycobacterium bovis BCG Moreau Rio de Janeiro* substrain, but it is safer than in the Brazilian population (48% of BCG-vaccinated SCID patients had disseminated infection) or in other global populations (34%).

Genetic diagnostics showed that the most common SCID genotypes in patients diagnosed by the Immunology Department CMHI between 2010 and 2023 were *IL2RG*, *RAG 1/2*, *JAK3*, and *ADA*.

In the *RAG1* gene, our patients have the dominant homozygous variant c.256_257delAA. The high prevalence of this variant among children from Eastern Poland and the presence of this variant in all Slavic peoples may indicate that it is a founder variant originating from the Vistula River basin in Poland, as presented in publication no. 4.

The causal treatment for SCID patients is HSCT, but some patients with severe infections or multi-organ failure die at diagnosis or in the peri-transplant period. The survival rate of SCID patients diagnosed by the Immunology Department CMHI in the years 2010-2023 was above 80% in patients with a positive family history and diagnosed in the first days and treated with HSCT in the first months of life, and in patients diagnosed after the onset of symptoms it was

68% (26/38), including 78% (26/34) who underwent HSCT (4 patients died before HSCT) – publication no. 1.

ERT was effective in all four treated patients with ADA-SCID. None of the patients underwent gene therapy, due to limited access to the procedure in a few centers in Europe and the longer duration of treatment and immune reconstitution with gene therapy compared to HSCT.

SCID is an ultra-rare disease in the European population, and some patients have unique symptom manifestations, as described in two case reports. Publication No. 5 describes a child with SCID of the Omenn syndrome type, accompanied by severe congenital macrocytic anemia. Molecular diagnostics revealed that the cause of the symptoms was ligase 1 deficiency. This is an extremely rare disease; to date, seven patients with ligase 1 deficiency have been described worldwide, with a diverse spectrum of immunological manifestations. Three of these patients (including our patient) underwent HSCT. Early diagnosis in this patient was due to the presence of severe macrocytic anemia, requiring numerous red blood cell transfusions and referral to a hematologist, who noted the accompanying lymphopenia. Publication No. 6 describes a patient with an atypical course of ADA-SCID in the form of dominant nephrological symptoms: atypical hemolytic uremic syndrome and renal failure were diagnosed in the first months, and ADA-SCID was suspected at the end-stage multiple organ failure.

The characteristics of clinical symptoms and patient test results presented in the above-mentioned works may allow for improving the diagnosis of SCID before organ complications occur and thus increasing the survival rate of these patients.

III. Słowa kluczowe w języku polskim i angielskim

SCID, atypowy SCID, zespół Omenna, limfopenia, immunoglobuliny M, deficyt deaminazy adenozyny, przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych, enzymatyczna terapia zastępcza, RAG1, RAG2, pierwotne niedobory odporności, rozmieszczenie geograficzne, zapadalność, dzieci słowiańskie, szczepionka BCG, rozsiane zakażenie BCG, komórki NK, ligaza typu 1, atypowy zespół hemolityczno-mocznicowy

SCID (severe combined immunodeficiency), atypical SCID, Omenn syndrome, lymphopenia, immunoglobulin M, adenosine deaminase (ADA) deficiency, HSCT (hematopoietic stem cell transplantation), ERT (enzyme replacement therapy), RAG1, RAG2, primary immunodeficiency, geographic distribution, incidence, Slavic children, BCG Moreau vaccine, disseminated BCG infection, NK cells, ligase 1, Omenn-like, atypical hemolytic uremic syndrome

IV. Wykaz skrótów

AD (ang. age of diagnosis) – wiek diagnozy
ADA (ang. adenosine deaminase) – deaminaza adenozyny
ADAMTS13 (ang. A Disintegrin-like And Metalloprotease with Thrombospondin motifs 13) - dezintegryna i metaloproteinaza z motywami trombospondyny 13
ADA-SCID – ciężki złożony niedobór odporności wywołany niedoborem deaminazy adenozyny
ADV (ang. Adenowirus) – adenowirus
aHUS (ang. atypical Hemolytic Uremic Syndrome) – atypowy zespół hemolityczno-mocznicowy
AS: (ang. atypical SCID) – atypowy ciężki złożony niedobór odporności
ATG (ang. antithymic globuline) – globulina antytymocytarna
BCG – *Bacillus Calmette-Guerin*
CID (ang. combined immunodeficiency) – złożony niedobór odporności
CMV (cytomegalovirus) – wirus cytomegalii
Cpm (ang. counts per minute) – liczba zliczeń na minutę
DD (ang. diagnostic delay) – opóźnienie diagnozy
EBMT (The European Society for Blood and Marrow Transplantation) – Europejskie Towarzystwo Transplantacji Krwi i Szpiku
EMA (European Medicines Agency) – Europejska Agencja Leków
ERN-RITA (The European Reference Network for Rare Immunological Disorders) – Europejska Sieć Referencyjna ds. Rzadkich Pierwotnych Niedoborów Odporności
ESID (The European Society for Immunodeficiencies) – Europejskie Towarzystwo Niedoborów Odporności
ETZ – enzymatyczna terapia zastępcza
EVA (ang. The European Variation Archive) – Europejskiego Archiwum Zmienności
GvHD (ang. Graft-versus-Host Disease) – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi.
HLA (ang. human leukocyte antigens) – ludzkie antygeny leukocytarne
HSCT (ang. hematopoietic stem cells transplantation) – przeszczepianie macierzystych komórek krwiotwórczych
HSV (ang. Herpes simplex virus) – wirus opryszczki
HUS (ang. Hemolytic Uremic Syndrome) – zespół hemolityczno-mocznicowy
IEI (ang. Inborn Errors of Immunity) – wrodzone błędy odporności

IgG – immunoglobuliny klasy G

IgM – immunoglobuliny klasy M

IL2RG – (ang. interleukin 2 receptor subunit gamma) – łańcuch gamma receptora dla interleukiny 2

IL7RA – (ang. interleukin-7 receptor alfa chain) – łańcuch alfa receptora dla interleukiny 7

IFNγ – interferon gamma

ITP (ang. immune thrombocytopena) – pierwotna małopłytkowość immunologiczna

IVIG (ang. intravenous immunoglobulin) – dożylny preparat immunoglobulin

JAK3 (ang. Janus Kinase 3) – kinaza Janusowa typu 3

KREC (ang. kappa-deleting excision circles) – koliste cząsteczki DNA powstałe po delecji łańcucha kappa

LIG1 – ligaza DNA 1

MSD (ang. matched sibling donor) – zgodny dawca rodzinny

MSMD (ang. mendelian susceptibility to mycobacterial disease) – mendlowska podatność na choroby mykobakteryjnej

MUD (ang. matched unrelated donor) – zgodny dawca niespokrewniony

NBS (ang. newborn screening) – przesiewowe badanie noworodków

NGS (ang. Next-Generation Sequencing) – sekwencjonowanie nowej generacji

NK (ang. natural killer) – naturalni zabójcy

OS (ang. Omenn syndrome) – zespół Omenna

PCR (ang. polymerase chain reaction) –łańcuchowa reakcja polimerazy

PHA (ang. phytohemagglutinin) – fitohemaglutynina

PIDTC (Primary Immune Deficiency Treatment Consortium) – Towarzystwo Leczenia Pierwotnych Niedoborów Odporności (USA)

PJP (ang. *Pneumocystis jiroveci* pneumonia) – zapalenie płuc wywołane przez *Pneumocytis jiroveci*

RAG1 (ang. recombination-activating gene 1) – gen aktywujący rekombinację 1

RAG2 (ang. recombination-activating gene 2) – gen aktywujący rekombinację 2

RSV (ang. Respiratory Syncytial Virus) – syncytialny wirus oddechowy

RTE (ang. recent thymic emigrants) – emigranci z grasicy

SCID (ang. Severe combined immunodeficiency) – ciężki złożony niedobór odporności

SI (stimulatig index) – indeks stymulacji

TCR (ang. T cell receptor) – receptor limfocyta T

TREC (ang. T cell receptor excision circles) – koliste cząsteczki receptora limfocyta T

TG – terapia genowa

TS (ang. typical SCID) – typowy ciężki złożony niedobór odporności

TTB – test transformacji blastycznej

TTP (ang. thrombotic thrombocytopenic purpura) – zakrzepowa plamica małopłytkowa

VZV (ang. Varicella Zoster Virus) – wirus Varicella Zoster

V. Wstęp

Ciężki złożony niedobór odporności (severe combined immunodeficiency - SCID) jest wrodzonym błędem odporności, wynikającym z zaburzeń dojrzewania i różnicowania limfocytów T z macierzystych komórek krwiotwórczych szpiku. W niektórych genotypach zaburzenie dojrzewania dotyczy również limfocytów B i/lub komórek NK. Częstość występowania choroby określana na podstawie badań przesiewowych noworodków, różni się w poszczególnych krajach i wynosi: w Niemczech 1:54 000, w USA 1:58 000 - 1:66 000, w Izraelu 1:29 000. W krajach z dużym odsetkiem małżeństw spokrewnionych częstość jest wyższa, np.: w Arabii Saudyjskiej 1:2 906, w Omanie 1:22 000 [1-6].

Noworodki rodzą się zdrowe, nie demonstrując objawów niedoboru odporności, jednak w pierwszych tygodniach i miesiącach życia rozwijają się u nich zakażenia bakteryjne, wirusowe, grzybicze, w tym oportunistyczne.

Objawy kliniczne SCID obejmują nawracające lub przewlekłe infekcje górnych i dolnych dróg oddechowych wywołane przez powszechne patogeny o nietypowym przebiegu, np. przewlekły nieżyt nosa, dolnych dróg oddechowych, np. wywołane przez adenowirusy lub wirusy paragrypy, zakażenia dróg moczowych, biegunki. Szczególnie groźne są zakażenia wywołane przez patogeny oportunistyczne (np. *Pneumocystis jiroveci,* cytomegalowirus (CMV)) lub grzyby. Mogą mieć postać od pozornie łagodnych nawracających pleśniawek, po skrajnie ciężkie objawowe~~go~~ zakażenia CMV z zajęciem płuc, wątroby i ośrodkowego układu nerwowego, aspergilozę z zajęciem narządów wewnętrznych (płuca, wątroba, śledziona, ośrodkowy układ nerwowy, kości). Rutynowe szczepienia żywymi atenuowanymi szczepionkami, takimi jak szczepionka BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) lub szczepionka przeciw rotawirusom, są przyczyną zakażeń miejscowych lub rozsianych. Powyższe manifestacje kliniczne prowadzą do zahamowanie rozwoju fizycznego niemowlęcia.

Drugą grupę stanowią objawy nieinfekcyjne (np. zmiany skórne o różnych charakterze, limfadenopatia, hepatomegalia, splenomegalia). Szczególną uwagę należy zwrócić na nieprawidłowości w badaniach diagnostycznych, w tym podstawowych (np. limfopenia, ale także limfocytoza, eozynofilia) oraz specjalistycznych, np. podwyższone IgE, brak grasicy i/lub dysplazje kostne w badaniach radiologicznych.

Wskazówką może być dodatni wywiad rodzinny w kierunku zgonów niemowląt i/lub małych dzieci bądź niedoborów odporności.

Diagnoza SCID stawiana jest na podstawie badań immunologicznych (immunofenotyp limfocytów krwi obwodowej oceniany metodą cytometrii przepływowej, badania funkcyjne

limfocytów - test transformacji blastycznej) oraz molekularnych z oceną wariantów genetycznych. W zależności od objawów klinicznych i wyników badań wyróżnia się postać typową, atypową (zwykle o łagodniejszym przebiegu) oraz zespół Omenna.

Kryteria diagnostyczne SCID, atypowego SCID i zespołu Omenna według kryteriów Towarzystwa Leczenia Pierwotnych Niedoborów Odporności (Primary Immune Deficiency Treatment Consortium - PIDTC) przedstawiono poniżej [7]:

• Typowy SCID:

- brak lub bardzo niska liczba limfocytów T (<0,05x10^9/l) i obecność wariantu patogennego w badaniu molekularnym lub brak alternatywnego wyjaśnienia niskiej liczby limfocytów T i <20% limfocytów T CD4+ z markerami powierzchniowymi limfocytów T dziewiczych (lub niewykrywalnymi/niskimi TREC (ang. T cell receptor excision circles – koliste cząsteczki receptora limfocyta T)),
- lub obecność limfocytów T pochodzenia matczynego (chimeryzm matczyno-płodowy);

• Atypowy SCID:

- dwa lub więcej z następujących kryteriów: zmniejszona liczba komórek T CD3+ (0,05–1,0 x 10^9/l u dzieci w wieku <2 lat, <0,8 x 10^9/l w wieku 2–4 lat, <0,6 x 10^9/l w każdym wieku); komórki T o oligoklonalnym rozkładzie; <20% komórek CD4+ to komórki dziewicze (lub nieprawidłowe TREC);
- wariant patogenny genu lub zmniejszona odpowiedź w teście transformacji blastycznej na fitohemaglutyninę (phytohemagglutinin - PHA), przeciwciała anty-CD3 lub anty-CD3/CD28 (<50% dolnej granicy zakresu referencyjnego);
- a także wykluczenie innego podtypu SCID, CID (ang. combined immunodeficiency – złożony niedobór odporności) o znanym genotypie, zaburzeń grasicy, innych zaburzeń z niską liczbą limfocytów T

• Zespół Omenna:

- uogólniona wysypka i brak chimeryzmu matczyno-płodowego,
- i wariant patogenny genu SCID,
- i >80% limfocytów T CD4+ ma fenotyp komórek pamięci CD45RO+,
- oraz dwa lub więcej spośród: eozynofilia (>0,8x10^9/l), podwyższone stężenie IgE, nieprawidłowe TREC, limfadenopatia, hepatomegalia i/lub splenomegalia, oligoklonalny rozkład limfocytów T.

Wśród pacjentów diagnozowanych w ramach badań przesiewowych noworodków dominuje postać typowa: 69% w USA [7] i 60% w Niemczech [2]. Postać atypowa częściej rozpoznawana jest już po wystąpieniu objawów klinicznych, np. u 53% pacjentów

diagnozowanych we Włoszech [12]. Wśród genów, w których zmiany patogenne─są najczęstszą przyczyną SCID wymienia się *IL2RG, RAG1/2, ADA, IL7R, DCLRE1C, JAK3*; stanowią one ponad 80% genotypów SCID w USA [7] i ponad 70% w Niemczech [2].

Choroba nieleczona prowadzi do zgonu w pierwszych latach życia, głównie z powodu zakażeń, w tym oportunistycznych. Leczeniem docelowym jest przede wszystkim przeszczepianie macierzystych komórek krwiotwórczych (hematopoietic stem cells transplantation - HSCT) oraz terapie genowe (TG). Terapie genowe są możliwe w Europie w odniesieniu do zmian patogennych dotyczących niektórych genów SCID - *ADA, IL2RG, RAG1, DCLRE1C*. Europejska Agencja Leków (EMA – European Medicines Agency) – zaopiniowała pozytywnie jedynie preparat Strimvelis w leczeniu ADA-SCID. W wybranych postaciach SCID do czasu leczenia docelowego wskazane jest prowadzenie enzymatycznej terapii zastępczej (ETZ). Opcja ETZ jest dostępna dla ADA-SCID. W zespole Omenna przed leczeniem docelowym stosuje się terapię immunosupresyjną.

Szczególną grupę stanowią pacjenci z ADA-SCID. Choroba jest wrodzonym ogólnoustrojowym zaburzeniem metabolizmu puryn do kwasu moczowego. Brak ADA prowadzi do gromadzenia substratów tego enzymu: adenozyny (Ado) i deoksyadenozyny (dAdo) oraz metabolitów, przede wszystkim deoksyadenozynotrifosforanu (dATP), ale też deoksyadenodifosforanu (dADP) oraz deoksyadenozynu monofosforan (dAMP). Nadmiar dATP i dAdo są uważane, za główne czynniki limfotoksyczne, prowadzące do powstania ciężkiego złożonego niedoboru odporności. W mechanizmie uszkodzenia innych narządów, jak mózg, płuca, wątroba również bierze się pod uwagę ich toksyczne działanie. ADA-SCID występuje z częstością 1:200 000 – 1: 1 milion urodzeń i stanowi około 10-20% wszystkich pacjentów z rozpoznaniem SCID. W leczeniu stosuje się przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych, jak również enzymatyczną terapię zastępczą oraz terapię genową [8].

Wczesne rozpoznanie SCID zwiększa szanse na skuteczne leczenie. Przeżycie niemowląt poddanych procedurze HSCT przed ukończeniem 3,5 miesięcy życia oraz przed wystąpieniem powikłań infekcyjnych wynosi 94%, a u starszych niemowląt z towarzyszącymi zakażeniami spada do 17-82% [9-10]. W niektórych krajach prowadzone są przesiewowe badania noworodków w celu wykrycia pacjentów ze SCID przed pojawieniem się zakażeń. Pozwala to na wcześniejszą i skuteczniejszą diagnostykę i leczenie. W Polsce dotychczas nie było powszechnego przesiewowego badania noworodków w kierunku SCID. Wczesna diagnoza mogła być postawiona jedynie u rodzeństwa dzieci z rozpoznanym SCID. Na skrócenie czasu od pojawienia się objawów klinicznych lub laboratoryjnych do postawienia

diagnozy wpływ ma znajomość objawów SCID, edukacja oraz wczesna identyfikacja chorych. Od połowy września 2025 na całym obszarze naszego kraju prowadzony jest pilotażowy program badań przesiewowych w kierunku SCID i innych postaci T i/lub B-limfopenii.

VI. Cele rozprawy doktorskiej

Cel główny:
Charakterystyka kliniczna i laboratoryjna, w tym immunogenetyczna pacjentów z różnymi postaciami SCID.

Cele szczegółowe:
Ocena manifestacji klinicznej (wiek i rodzaj pierwszych objawów klinicznych, wiek rozpoznania, czas opóźnienia diagnozy, przeżycie), parametrów laboratoryjnych (podstawowych jak limfopenia oraz immunogenetycznych) oraz znaczenia roli specjalistów wysuwających podejrzenie w różnych postaciach SCID.

Charakterystyka kliniczna, laboratoryjna i immunogenetyczna polskich pacjentów z rozpoznaniem ADA-SCID.

Ocena efektów leczenia ETZ dzieci z ADA-SCID w Klinice Immunologii IPCZD.

Ocena częstości występowania niepożądanych odczynów poszczepiennych po podaniu żywej szczepionki BCG Moreau u pacjentów ze SCID w Polsce.

Ocena częstości występowania, obrazu klinicznego, zmienności genetycznej u pacjentów z rozpoznaniem SCID wywołanym wariantami w genach *RAG1*/*RAG2* w populacjach zamieszkujących kraje słowiańskie.

Przedstawienie ultrarzadkich i nietypowych postaci SCID.

VII. Wykaz publikacji

Rozprawę na stopień doktora nauk medycznych stanowi cykl sześciu publikacji: cztery o charakterze artykułów oryginalnych oraz dwa opisy przypadków.

- Wykaz publikacji oryginalnych:

1. **Dąbrowska-Leonik Nel**, Piątosa Barbara, Bohynikova Nadezda, Grzywa-Czuba Renata, Wolska-Kuśnierz Beata, Bernat-Sitarz Katarzyna, Skomska-Pawliszak Małgorzata, Bernatowska Ewa, Pac Małgorzata. What pediatrician should know about different types of severe combined immunodeficiency – a single center experience. Pediatria Polska - Polish Journal of Paediatrics. Pediatr Pol 2026; 101 (1): 8-16. doi.org/10.5114/polp.2026.159958
   Praca oryginalna
   Punktacja MSWiA: 100
   Wkład autorski: koncepcja pracy, zbieranie danych klinicznych, napisanie pierwotnej wersji, akceptacja ostatecznej wersji pracy
2. **Dąbrowska-Leonik Nel,** Piątosa Barbara, Słomińska Ewa, Bohynikowa Nadeżda, Bernat-Sitarz Katarzyna, Bernatowska Ewa, Wolska-Kuśnierz Beata, Kałwak Krzysztof, Kołtan Sylwia, Dąbrowska Anna, Goździk Jolanta, Ussowicz Marek, Pac Małgorzata. National experience with adenosine deaminase deficiency related SCID in Polish children. Frontiers in Immunology: 2023: Vol. 14, January 2023, Article 1058623. Doi: 10.3389/fimmu.2022.1058623
   Praca oryginalna
   Impact Factor: 7,3
   Punktacja MNiSW: 140
   Wkład autorski: koncepcja pracy, zbieranie danych klinicznych, napisanie pierwotnej wersji, akceptacja ostatecznej wersji pracy
3. Bernatowska Ewa, Skomska-Pawliszak Małgorzata, Wolska-Kuśnierz Beata, Pac Małgorzata, Heropolitańska-Pliszka Edyta, Pietrucha Barbara, Bernat-Sitarz Katarzyna, **Dąbrowska-Leonik Nel**, Bohynikowa Nadeżda, Piątosa Barbara, Lutyńska Anna, Augustynowicz Ewa, Augustynowicz-Kopeć Ewa, Korzeniewska-Koseła Maria, Krasińska Maria, Krzysztopa-Grzybowska Katarzyna, Wieteska-Klimczak Anna, Książyk Janusz, Jackowska Teresa, van der Burg Mirjam, van

Dongen Jacques J.M., Casanova Jean-Laurent, Picard Capucine, Mikołuć Bożena. BCG Moreau vaccine safety profile and NK cells-double protection against disseminated BCG infection in retrospective study of BCG vaccination in 52 Polish children with severe combined immunodeficiency. Journal of Clinical Immunology: 2020: Vol. 40, Nr 1, s. 138-146. doi: 10.1007/s10875-019-00709-1. Epub 2019 Nov 20. PMID: 31749033; PMCID: PMC7082382.

Praca oryginalna

Impact Factor: 8,317

Punktacja MNiSW: 100

Wkład autorski: zbieranie danych klinicznych, akceptacja ostatecznej wersji pracy

4. Sharapova Svetlana O., Skomska-Pawliszak Małgorzata, Rodina Yulia A., Wolska-Kuśnierz Beata, **Dąbrowska-Leonik Nel**, Mikołuć Bożena, Pashchenko Olga E., Pasic Srdjan, Freiberger Tomas, Milota Tomas, Formankova Renata, Szaflarska Anna, Siedlar Maciej, Avcin Tadej, Markelj Gasper, Ciznar Peter, Kalwak Krzysztof, Kołtan Sylwia, Jackowska Teresa, Drabko Katarzyna, Gagro Alenka, Pac Małgorzata, Naumova Elissaveta, Kandilarova Snezhina, Babol-Pokora Katarzyna, Varabyou Dzmitry S., Barendregt Barbara H., Raykina Elena V., Varlamova Tatiana V., Pavlova Anna V., Grombirikova Hana, Debeljak Marusa, Mersiyanova Irina V., Bondarenko Anastasia V., Chernyshova Liudmyla I., Kostyuchenko Larysa V., Guseva Marina N., Rascon Jelena, Muleviciene Audrone, Preiksaitiene Egle, Geier Christoph B., Leiss-Piller Alexander, Yamazaki Yasuhiro, Kawai Tomoki, Walter Jolan E., Kondratenko Irina V., Sediva Anna, van der Burg Mirjam, Kuzmenko Natalia B., Notarangelo Luigi D., Bernatowska Ewa, Aleinikova Olga V. The clinical and genetic spectrum of 82 patients with RAG deficiency including a c.256_257delAA founder variant in Slavic countries. Frontiers in Immunology: 2020: Vol. 11, June 2020, s. e900. doi: 10.3389/fimmu.2020.00900. PMID: 32655540; PMCID: PMC7325958.

   Praca oryginalna

   Impact Factor: 7,561

   Punktacja MNiSW: 140

   Wkład autorski: zbieranie danych klinicznych, akceptacja ostatecznej wersji pracy

- Wykaz publikacji opisów przypadków:

5. **Dąbrowska-Leonik Nel,** Pastorczak Agata Karolina, Bąbol-Pokora Katarzyna, Bernat-Sitarz Katarzyna, Piątosa Barbara, Heropolitańska-Pliszka Edyta, Kacprzak Magdalena M., Kalwak Krzysztof, Gul Katarzyna, van der Burg Mirjam, Ussowicz Marek, Pac Małgorzata. Case report: severe combined immunodeficiency with ligase 1 deficiency and Omenn-like manifestation. Frontiers in Immunology: 2022: Vol. 13, October 2022, Article 033338. doi: 10.3389/fimmu.2022.1033338. PMID: 36341401; PMCID: PMC9626757.
   Opis przypadku
   Impact Factor: 7,3
   Punktacja MNiSW: 140
6. Bogdał A, Badeński A, Pac M, Wójcicka A, Badeńska M, Didyk A, Trembecka-Dubel E, **Dąbrowska-Leonik N**, Walaszczyk M, Matysiak N, Morawiec-Knysak A, Szczepański T, Szczepańska M. Atypical Hemolytic Uremic Syndrome (aHUS) and Adenosine Deaminase (ADA)-Deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-Two Diseases That Exacerbate Each Other: Case Report. Int J Mol Sci. 2021 Aug 31;22(17):9479. doi: 10.3390/ijms22179479. PMID: 34502390; PMCID: PMC8430959.
   Opis przypadku
   Impact Factor: 6,208
   Punktacja MNiSW: 140
   Wkład w autorski: przygotowanie pierwotnej wersji pracy

VIII. Materiał i metody

W pracy pierwszej pt. „What pediatrician should know about different types of severe combined immunodeficiency – a single center experience. Co pediatra powinien wiedzieć o różnych postaciach ciężkiego złożonego niedoboru odporności – doświadczenia jednego ośrodka" badaniem objęto 42 dzieci (16 dziewczynek i 26 chłopców) w wieku od 6 dni do 48 miesięcy, u których zdiagnozowano SCID przez zespół Kliniki Immunologii IPCZD w latach 2010–2023. Retrospektywnie oceniono przebieg kliniczny oraz badania hematologiczne, biochemiczne, immunologiczne i genetyczne prowadzące do rozpoznania SCID. Żaden z pacjentów nie przeszedł badań przesiewowych noworodków w kierunku SCID, jednak 6 miało dodatni wywiad rodzinny.

Analizę subpopulacji limfocytów przeprowadzono przy użyciu dostępnych sześciokolorowych przeciwciał BD Multitest i probówek Trucount (Becton Dickinson, nr kat. 644611). Oceniany panel subpopulacji limfocytów obejmował limfocyty T (CD3+/CD45+), cytotoksyczne limfocyty T (CD3+CD8+/CD45+), pomocnicze komórki T (CD3+CD4+/CD45+), komórki NK (CD16+CD56+CD3-/CD45+) i limfocyty B (CD19+/CD45+). Procedurę barwienia wykonano zgodnie z instrukcją producenta. Identyfikację subpopulacji limfocytów przeprowadzono zgodnie ze standardowymi procedurami. Bezwzględną liczbę poszczególnych subpopulacji obliczono na podstawie proporcji odpowiedniej subpopulacji komórek i bezwzględnej liczby limfocytów. Wyniki porównano z prawidłowymi zakresami referencyjnymi związanymi z wiekiem [13]. Wczesnych emigrantów grasicy (CD31+CD45RA+/CD3+CD4+) w populacji pomocniczych komórek T przeanalizowano oddzielnie, a wyniki porównano z lokalnymi zakresami referencyjnymi (Piątosa B i in. niepublikowane dane).

Test transformacji blastycznej prowadzono na komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, które hodowano w podłożu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 uzupełnionym o 10% inaktywowaną cieplnie surowicę płodową bydlęcą, w 3 powtórzeniach: bez mitogenu (kontrola), z PHA i z przeciwciałem monoklonalnym anty-CD3, aby ocenić różne mechanizmy stymulacji limfocytów T [14]. Do pomiaru odpowiedzi limfoproliferacyjnej wykorzystano włączenie 3H-tymidyny do proliferujących limfocytów [15]. Obliczono średnią liczbę zliczeń na minutę (cpm, counts per minute) i odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń dla hodowli z lub bez testowanych stymulantów. Wyliczono wskaźnik stymulacji (SI, stimulating index) mierzący odpowiedź badanych komórek w odniesieniu do

niestymulowanej kontroli. Uzyskane wyniki porównano z wartościami prawidłowymi PHA (≥16000 cpm, SI: ≥65) i anty-CD3 (≥15000 cpm, SI: ≥60).

Immunoglobuliny G (IgG) i M (IgM) oznaczono metodą nefelometrii na zautomatyzowanych urządzeniach BN ProSpec i Atellica® NEPH 630 firmy Siemens Healthineers (od 2019 r.) przy użyciu przeciwciał monoklonalnych o wysokiej specyficzności, a wyniki porównano z lokalnymi zakresami referencyjnymi [16].

Diagnostyka molekularna obejmowała sekwencjonowanie całego genu metodą Sangera lub sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) dla panelu genów pierwotnego niedoboru odporności z potwierdzającym sekwencjonowaniem metodą Sangera w docelowym regionie, i przeprowadzana była w różnych laboratoriach genetycznych (Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, Rotterdam, Holandia; Uniwersytet Medyczny w Warszawie; Centrum Medyczne MedGen, Warszawa, Polska).

Do diagnozy SCID zastosowano kryteria Primary Immune Deficiency Treatment Consortium (PIDTC): typowy SCID, atypowy SCID i zespół Omenna [7]. Kryterium wykluczenia była wrodzona atymia [17], a także złożone niedobory odporności o znanym genotypie i inne zaburzenia z niską liczbą komórek T.

Opóźnienie diagnozy określano jako czas w miesiącach od pojawienia się pierwszych objawów klinicznych lub laboratoryjnych do postawienia rozpoznania SCID.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania TIBCO Statistica w wersji 13.3 (TIBCO Software Inc., Santa Clara, Kalifornia, USA). Rozkład danych nie był normalny, co zostało potwierdzone testem normalności Shapiro-Wilka. Porównanie danych między trzema grupami przeprowadzono przy użyciu testu Chi2 Pearsona dla danych nominalnych i testu Kruskala-Wallisa dla zmiennych porządkowych i ilościowych. Istotność statystyczną wyników na poziomie $p < 0,05$.

Badanie przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Deklaracji Helsińskiej dotyczących badań biomedycznych z udziałem ludzi i zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyki przy IPCZD (decyzja nr 30/KBE/2023).

W pracy 2, pt. „National experience with adenosine deaminase deficiency related SCID in Polish children" badaniem objęto 7 dzieci z rozpoznaniem ADA-SCID, zdiagnozowanych w kilku ośrodkach w Polsce w latach 2010 - 2022, w tym 5 zdiagnozowanych w Oddziale Immunologii IPCZD. Dokonano retrospektywnej analizy objawów klinicznych i wyników badań prowadzących do postawienia rozpoznania SCID: morfologii krwi obwodowej (leukopenia, limfopenia, neutropenia), aktywności transaminaz, stężenia IgG, IgA, IgM

wykonanych metodą nefelometryczną, subpopulacji limfocytów oznaczonych w cytometrze przepływowym (CD3, CD4, CD8, CD19, CD16+56+CD3-), aktywności deaminazy adenozyny w erytrocytach, badań genetycznych metodą Sangera lub sekwencjonowania całego eksomu i analizy wybranego panelu genów korelowanych z niedoborami odporności. Ocenę efektów leczenia ETZ 4 dzieci prowadzono porównując liczbę limfocytów przed leczeniem oraz w trakcie leczenia, do czasu przeprowadzenia HSCT.
Badanie przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Deklaracji Helsińskiej dotyczącej badań biomedycznych z udziałem ludzi i zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyki przy IPCZD (decyzja nr 21/KBE/2022).

W pracy 3 pt. „BCG Moreau vaccine safety profile and NK cells-double protection against disseminated BCG infection in retrospective study of BCG vaccination in 52 Polish children with severe combined immunodeficiency" badaniem objęto 52 pacjentów z rozpoznaniem SCID, zaszczepionych zgodnie z obowiązującym w Polsce Programem Szczepień Ochronnych (PSO) po urodzeniu szczepionką BCG, hospitalizowanych w IPCZD w latach 1980-2015. Zlokalizowane zakażenie BCG określano jako zmianę w miejscu zaszczepienia (> 10 mm) i/lub zapalenie węzłów chłonnych ograniczone do okolicy miejsca zaszczepienia, a rozsiane zakażenie BCG definiowano jako proces rozprzestrzeniający się na dwa lub więcej obszarów poza miejsce zaszczepienia.
Analizy statystyczne wykonano przy użyciu programów STATISTICA w 10.0 i Microsoft Excel w 2007; w celu sprawdzenia, czy zmienna ilościowa pochodzi z populacji o rozkładzie normalnym, wykorzystano test Shapiro-Wilka; ocenę różnic pomiędzy grupami (model zmiennych niesparowanych) przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta lub testu U Manna-Whitneya; dla zmiennych jakościowych zastosowano test Chi-kwadrat i dokładny test niezależności Fishera; w celu określenia zależności, siły i kierunku pomiędzy zmiennymi wykorzystano analizę korelacji Pearsona lub Spearmana. Analizę statystyczną retrospektywnego badania 52 pacjentów ze SCID hospitalizowanych w IPCZD porównano z analizą 349 pacjentów SCID zbadaną przez Beatriz E. Marciano i współautorów [11].
Badanie przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Deklaracji Helsińskiej w sprawie badań biomedycznych z udziałem ludzi i zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną przy IPCZD (decyzja nr 51/KBE/2017).

W pracy 4 pt. „The clinical and genetic spectrum of 82 patients with RAG deficiency including a c.256_257delAA founder variant in Slavic countries" badaniem objęto 82

pacjentów z krajów słowiańskich urodzonych w latach 1992-2018, z rozpoznaniem SCID wywołanym wariantami patogennymi w genach *RAG1* lub *RAG2*. Sekwencjonowanie genów *RAG1/RAG2* przeprowadzono przy użyciu standardowych technik (panelowych, Sanger) w lokalnych laboratoriach w Europie; mapowanie wariantów wykonano programem ArcGIS 10.5 na mapie Europy Środkowo-Wschodniej i Rosji. Częstotliwości występowania alleli genów *RAG* porównano za pomocą testu chi-kwadrat lub dokładnego testu Fishera; analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu GraphPad Prism w wersji 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornia, USA).
Uzyskano pisemną zgodę rodziców na udział w badaniu i badanie zostało zaaprobowane przez Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology, and Immunology (IRB0012-2015).

W pracy 5 pt. "Case report: severe combined immunodeficiency with ligase 1 deficiency and Omenn-like manifestation" i 6 pt. "Atypical Hemolytic Uremic Syndrome (aHUS) and Adenosine Deaminase (ADA)-Deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-Two Diseases That Exacerbate Each Other: Case Report" przedstawiono opisy przypadków.

IX. Wyniki i dyskusja

IX.1. Wyniki i dyskusja publikacji numer 1

W Klinice Immunologii IPCZD w latach 2010–2023 SCID zdiagnozowano u 42 dzieci (16 dziewczynek i 26 chłopców), w tym: u 17 dzieci rozpoznano typowy SCID (TS), u 19 - atypowy SCID (AS), u 6 zespół Omenna (OS). U 36 dzieci, nie objętych badaniami przesiewowymi noworodków, rozpoznanie postawiono po wystąpieniu objawów między 2 a 48 miesiącem życia (mediana 6 miesięcy). Mediana wieku wystąpienia pierwszych objawów wyniosła 2 miesiące. Sześcioro dzieci miało dodatni wywiad rodzinny, a u większości diagnozę postawiono w pierwszych 2 tygodniach życia, przed wystąpieniem objawów. TS zdiagnozowano u 17 dzieci: u 5 z dodatnim wywiadem rodzinnym, u kolejnych 12 po wystąpieniu objawów. AS i OS zdiagnozowano odpowiednio u 19 i 6 dzieci. U dzieci z AS pierwsze objawy pojawiły się później, mediana wieku 4,9 miesiąca, a diagnozę postawiono znacznie później, mediana wieku 8 miesięcy. Mediana opóźnienia diagnozy (DD – diagnostic delay) w całej badanej grupie wyniosła 2,5 miesiąca, w tym: 2,4 miesiąca w typowym SCID, 1,7 miesiąca w zespole Omenna i 4,7 miesiąca u dzieci z atypowym SCID [Tabela 1].

Dzieci były kierowane na dalszą diagnostykę głównie przez pediatrów (44%). U około 20% wszystkich pacjentów i u ponad 25% dzieci z AS podejrzenie SCID było wysunięte przez hematologa. Około 60% pacjentów z OS zostało skierowanych przez dermatologów [Tabela 2]. DD różniło się w zależności od kierującego specjalisty i było dłuższe u pacjentów skierowanych przez hematologów: mediana 20 miesięcy [Tabela 3].

Pierwszymi objawami były infekcje (64% dzieci z objawowym SCID i 83% dzieci z objawowym TS), zmiany skórne (22,2% wszystkich dzieci objawowych i 80% dzieci z OS), przewlekła biegunka (5,6%), anemia (5,6%) i limfopenia (2,8%); nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy podtypami SCID [Tabela 2].

Zakażenia

Najczęściej zgłaszanym powikłaniem było miejscowe lub rozsiane zakażenie BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) po obowiązkowym szczepieniu w ciągu pierwszych 48 godzin życia. Ponad 50% zaszczepionych pacjentów (18 z 32) miało powikłania związane ze szczepieniem BCG, w tym 5 (16%) rozwinęło rozsiane zakażenie BCG. Dzieci wymagały leczenia przeciwgruźliczego zgodnie z polskimi i europejskimi wytycznymi [18, 19]. Zakażenie to występowało częściej w TS niż w AS i OS: odpowiednio u 83%, 44% i 25% pacjentów [Tabela 2].

Inne zakażenia bakteryjne i grzybicze, w tym oportunistyczne, były rzadsze. [Tabela 2]. Zakażenia przewodu pokarmowego występowały sporadycznie i nie zostały uwzględnione w analizie.

Objawy niezakaźne

U 8 pacjentów pierwszym i głównym objawem były zmiany skórne. Erytrodermia złuszczająca z eozynofilią była pierwszym objawem u 4 niemowląt. Troje z nich z ostatecznym rozpoznaniem zespołu Omenna zostało skierowanych przez dermatologów, a mediana DD wynosiła 1 miesiąc. U pozostałych 5 dzieci ze zmianami skórnymi rozpoznano SCID po wystąpieniu zakażenia, pomimo że 4 z nich (80%) miało limfopenię we wcześniejszych wynikach badań.

Ciężka niedokrwistość, głównie niedokrwistość autoimmunohemolityczna (AIHA), była powodem opieki hematologicznej u 7 pacjentów. U wszystkich obserwowano również limfopenię, chociaż była ona powodem dalszej diagnostyki immunologicznej tylko u 2 z nich. U tej dwójki dzieci rozpoznanie (AD - age of diagnosis) postawiono między 2 a 5 miesiącem życia, a opóźnienie rozpoznania (DD – diagnostic delay) wyniosło 1-2 miesiące. U pozostałych 5 dzieci atypowy SCID rozpoznano później, gdy pojawiły się ciężkie zakażenia: nawracające zapalenie płuc u 4 dzieci i toksoplazmowe zapalenie siatkówki prowadzące do utraty wzroku u 1 pacjenta (AD 3–48 mies.; DD 2–42 mies.). Wśród tych dzieci 4 miało wysokie stężenie IgM (w zakresie 1,85–6,83 g/l). U 3 z nich diagnostyka genetyczna wykazała ten sam homozygotyczny wariant w genie *RAG1* (c.256_257delAA), określony jako wariant dorzecza Wisły [Publikacja nr 4].

Izolowana limfopenia doprowadziła do podejrzenia SCID tylko u 1 pacjenta, podczas gdy w momencie rozpoznania SCID 80% pacjentów miało limfopenię w morfologii krwi, istotnie częściej u dzieci z TS i AS niż z OS [Tabela 2]. Neutropenia i eozynofilia były mniej częste, występowały odpowiednio u 36% i 31% dzieci.

Ocena immunologiczna i immunogenetyczna

Rozpoznanie TS postawiono u 17 dzieci zgodnie z kryteriami PIDTC [7] na podstawie liczby limfocytów T poniżej 50 komórek/ml i po wykluczenia innych przyczyn ciężkiej limfopenii T. RTE oceniono tylko u 3 pacjentów z powodu bardzo niskiej liczby limfocytów T [Tabela 1].

AS rozpoznano u 19 pacjentów, z liczbą limfocytów T poniżej 1000 komórek/ml u 18 z nich, RTE <20% u 13/15 pacjentów (mediana 2,1%), zmniejszoną odpowiedzią limfoproliferacyjną

na PHA <50% dolnej granicy wartości referencyjnych u 12/13 pacjentów (mediana 11,1 SI, wartość prawidłowa >65 SI) i zmniejszoną odpowiedzią limfoproliferacyjną na anty-CD3 <50% dolnej granicy wartości referencyjnych u 10/13 dzieci (mediana 15,3 SI, wartość prawidłowa >60 SI) [Tabela 1].

OS zdiagnozowano u 6 dzieci z uogólnionymi zmianami skórnymi i liczbą limfocytów T w zakresie 106–80 943 komórek/ml. RTE określono u 5 pacjentów, u wszystkich z wartościami poniżej 5%. Mediana odpowiedzi limfoproliferacyjnej na PHA mierzona jako SI wynosiła 8,8, a na anty-CD3 – 11,05 (wartości referencyjne odpowiednio: 65 i 60). Wszystkie 6 dzieci z OS miały eozynofilię, 4 z 5 z podwyższonym stężeniem IgE. Trzech pacjentów zostało włączonych do tej grupy pomimo braku rozpoznania genetycznego ze względu na ograniczone możliwości diagnostyki genetycznej.

Stężenia zarówno IgG, jak i IgM były poniżej wartości referencyjnych wieku jedynie u 17,1% pacjentów, częściej w TS – 23,5%, niż w AS lub OS – odpowiednio 11,1% i 16,7%. Samo IgM było poniżej normy u 45% dzieci, prawidłowe u 32,5% i podwyższone u 22,5%. Wysokie IgM obserwowano częściej u dzieci z AS (38,9%) niż w typowych postaciach (6,3%) lub zespole Omenna (16,7%), ale nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic. [Tabela 2].

U 31 pacjentów uzyskano potwierdzenie genetyczne SCID, najczęściej były to warianty patogenne w następujących genach: *IL2RG* (10 pacjentów), *RAG1/2* (łącznie 7 pacjentów), *JAK3* (6 pacjentów) i *ADA* (5 pacjentów) [Tabela 2].

Trzynastu z 42 analizowanych pacjentów zmarło do końca 2025 roku. Zgony wystąpiły u jednej trzeciej pacjentów objawowych i u 17% pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym. Czworo dzieci zmarło przed przeszczepieniem macierzystych komórek krwiotwórczych (HSCT) w wyniku ciężkich infekcji, a 9 zmarło po HSCT: 5 z nich z powodu infekcji i 4 z powodu powikłań niezakaźnych.

Dyskusja

SCID należy diagnozować jak najwcześniej, ponieważ istnieje większa szansa na skuteczniejsze leczenie przed wystąpieniem poważnej infekcji i/lub nieodwracalnego uszkodzenia narządów [20]. Dodatni wywiad rodzinny w kierunku SCID zwiększa prawdopodobieństwo wczesnego rozpoznania, leczenia i przeżycia. W naszej grupie wskaźnik przeżywalności takich niemowląt wyniósł 83%, podczas gdy wskaźnik przeżywalności pacjentów objawowych wyniósł zaledwie 67%. Obserwujemy postęp w diagnostyce w ciągu ostatnich 3 dekad. Porównując wcześniejsze dane z lat 1993–2006, Wolskiej-Kuśnierz

(„Ocena wyników leczenia i rekonstytucji układu odpornościowego u pacjentów z pierwotnymi niedoborami odporności po przeszczepieniu komórek macierzystych układu krwiotwórczego", rozprawa doktorska, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka", 2008, Warszawa, Polska) z obecnymi wynikami, w porównywalnym okresie 14 lat zdiagnozowano zarówno więcej pacjentów (42 w porównaniu z 23), jak i w młodszym wieku. Mediana wieku diagnozy SCID spadła z 7 do 4,4 miesiąca, a mediana opóźnienia diagnozy skróciła się z 5 do 2,5 miesiąca. Świadczy to o wyższej świadomości wśród lekarzy pediatrów, rodzinnych i specjalistów kierujących pacjentów do diagnostyki w kierunku SCID, choć poprawy wymaga wcześniejsza diagnostyka niemowląt z limfopenią. Warto podkreślić, że poprawiła się dostępność badań immunologicznych, w tym cytometrii przepływowej, a także metod genetycznych. Wcześniej diagnostykę genetyczną wykonywano wyłącznie metodą Sangera, a potwierdzenie genetyczne uzyskano tylko u 57% pacjentów (5 *IL2RG*, 3 *RAG1*, 3 *RAG2*, 1 *IL7RA* i *NHEJ1*). Obecnie dzięki NGS potwierdzenie genetyczne uzyskuje 74% pacjentów. Nadal jednak konieczna jest poprawa diagnostyki SCID. Wiadomo, że wczesna diagnoza jest możliwa dzięki badaniom przesiewowym noworodków (newborn screening - NBS) w kierunku SCID [21]. W Polsce badania pilotażowe są prowadzone od września 2025 r. W polsko-niemieckim transgranicznym badaniu naukowym NBS wśród polskich niemowląt nie stwierdzono przypadków SCID, jednak wykryto 1 dziecko z CID i 1 z agammaglobulinemią [22]. Badania przesiewowe noworodków oparte na TREC doprowadziły do zwiększonej wykrywalności niemowląt ze SCID i ciężką limfopenią T w wielu krajach europejskich [21]. W krajach, w których nie ma programu NBS, SCID można podejrzewać albo po wystąpieniu objawów, albo na podstawie dodatniego wywiadu rodzinnego. Edukowanie pediatrów i innych specjalistów na temat pierwszych objawów SCID jest ważnym elementem wczesnej diagnozy.

SCID najczęściej podejrzewali pediatrzy (do 75% w TS), hematolodzy (ponad 25% w AS) i dermatolodzy (60% pacjentów z OS). Opóźnienie diagnostyczne (DD) było krótsze u pacjentów kierowanych przez dermatologów, ale dotyczyło jedynie ograniczonej liczby pacjentów z rozpoznaniem OS. Można to tłumaczyć bardzo ciężkim przebiegiem klinicznym obejmującym zmiany skórne nieodpowiadające na leczenie. Dłuższe opóźnienie w rozpoznaniu u pacjentów kierowanych przez hematologów może wynikać z łagodniejszego przebiegu (u większości dzieci z atypową postacią) i obecności nakładających się innych przyczyn limfopenii, takich jak niepożądane reakcje na leki. Brak jest danych literaturowych na temat DD w SCID w zależności od kierującego specjalisty. Warto zauważyć, że obecnie

podejrzenie choroby w wielu krajach ustala się na podstawie badań przesiewowych noworodków [2, 7, 23].

W naszej kohorcie nawracające, przewlekłe lub atypowe infekcje były pierwszymi objawami u 69% wszystkich dzieci. Najczęstszym zakażeniem w tej grupie pacjentów było zakażenie prątkiem BCG o zazwyczaj łagodnym przebiegu klinicznym. Powikłanie to występowało istotnie częściej u dzieci z TS niż u dzieci z AS i OS. Bezwzględna liczba komórek NK nie miała wpływu na częstość miejscowej reakcji BCG, ale wydawała się odgrywać rolę w ochronie pacjentów SCID przed rozsianymi powikłaniami BCG, jak stwierdzono w innej grupie naszych pacjentów z rozpoznaniem SCID (Publikacja nr 3).

Analiza retrospektywna wykazała, że 80% wszystkich naszych pacjentów SCID miało wcześniej stwierdzoną limfopenię w morfologii krwi, ale limfopenia była przyczyną podejrzenia SCID tylko u jednego pacjenta. Limfopenia jest ważnym objawem SCID i nie należy jej lekceważyć, jeśli zostanie wykryta u pozornie zdrowego niemowlęcia. Analiza immunofenotypu limfocytów krwi obwodowej metodą cytometrii przepływowej umożliwia wykrycie SCID przed wystąpieniem objawów zagrażających życiu i powikłań narządowych. Tureccy neonatolodzy wskazują na potrzebę diagnozy SCID u noworodków z limfopenią, zdefiniowaną jako liczba limfocytów poniżej 3000 komórek/ml w prospektywnym badaniu 2000 noworodków [24]. Diagnozę SCID należy rozważyć u wszystkich niemowląt z limfopenią, nie tylko w przypadku braku programu NBS. Niezwykle ważna jest ocena obecności i wielkości grasicy oraz dysplazji kostnych na zdjęciu rentgenowskim klatki piersiowej. Pamiętać należy, że brak limfopenii i prawidłowy poziom immunoglobulin nie wykluczają diagnozy SCID. Dzieci z *IL2RG* SCID mogą mieć prawidłową liczbę limfocytów we krwi obwodowej, ale w badaniu cytometrii przepływowej stwierdza się tylko limfocyty B, jak to miało miejsce u jednego z naszych pacjentów. Innym wyjaśnieniem limfocytozy jest chimeryzm matczyno-płodowy lub oligoklonalna limfoproliferacja w OS.

Pomiar immunoglobulin rzadko pomaga w diagnozie SCID. Stężenie IgG może mieścić się w granicach wartości referencyjnych w pierwszych miesiącach życia, ze względu na bierne przeniesienie przeciwciał od matki do płodu przez łożysko. W naszej grupie niskie stężenie IgG wykryto tylko u 41,5%. Ponieważ niskie stężenie IgA występuje u zdrowych niemowląt i małych dzieci do 4 roku życia, mają one ograniczoną wartość diagnostyczną. Jak już przedstawiono w wynikach – wysokie stężenia IgM obserwowano u niektórych pacjentów objawowych, bez istotnych różnic między wszystkimi podtypami SCID. Podwyższone stężenia zarówno IgM, jak i IgG stwierdzono u pacjentów z niedoborem RAG, autoimmunizacją i nadmiernym zapaleniem w AS i OS. U pacjentów z niedoborem RAG

zaburzony proces rekombinacji V(D)J prowadzi do zaburzonego repertuaru receptorów limfocytów T i B (TCR/BCR) [25]. Dodatkowo, zaburzona jest tolerancja obwodowa i centralna komórek T i B, co pozwala na przeżycie komórek autoreaktywnych [26]. Wysokie stężenia IgM obserwowali również inni autorzy. W grupie SCID z Indii 19% badanych pacjentów miało stężenia IgM powyżej wartości referencyjnych dla wieku [10].

Częstotliwość występowania genów SCID jest różna w różnych populacjach. W naszej grupie dzieci najczęściej występowały patogenne warianty w genie *IL2RG* (24%), podobnie jest w populacji USA – 30%, populacji niemieckiej i holenderskiej – po 20% [2, 7, 23], a wyraźnie dominują w populacji chińskiej i południowo-wschodniej Azji [27-28] – 53–73% defektów potwierdzonych genetycznie. W populacjach Omanu, Iranu i Turcji zmiany patogenne w genie *IL2RG* stanowią mniej niż 10% zidentyfikowanych genów SCID, podczas gdy najczęstszym genotypem jest *RAG1/2*, prawdopodobnie ze względu na wyższą częstość występowania rodziców spokrewnionych [4, 29, 30]. Geny *RAG1/2* są również najczęstszą przyczyną SCID w Indiach, Włoszech, Serbii i Czarnogórze [10, 12, 31].

IX.2. Wyniki i dyskusja publikacji numer 2

Rozpoznanie ADA-SCID było postawione u 7 dzieci, w wieku od 7 tygodni do 27 miesięcy życia, u pierwszych 3 pacjentów w wieku 16-27 miesięcy, a u ostatnich 4 pomiędzy 7 tygodniem, a 6 miesiącem życia [Tabela 4]. U żadnego z pacjentów nie było dodatniego wywiadu rodzinnego ani nie wykryto go w ramach polsko-niemieckiego transgranicznego projektu badań przesiewowych noworodków „RareScreen", ograniczonego do jednego województwa. [22]. W momencie podejrzenia rozpoznania SCID wszyscy pacjenci mieli leukopenię z neutropenią i limfopenią. Wśród objawów pozaszpikowych obserwowano: wzmożoną aktywność transaminaz (5 pacjentów, 71%), dysplazje szkieletowe (2 pacjentów, 28,5%, Rycina 1A), zmiany zanikowe ośrodkowego układu nerwowego (1 pacjent), atypowy zespół hemolityczno-mocznicowy (1 pacjent – P3). U pacjenta P3, leczonego z powodu ciężkich objawów nefrologicznych, tj. atypowego zespołu hemolityczno-mocznicowego (aHUS) i nadciśnienia tętniczego podejrzenie SCID wysunięto dopiero w wieku 15 miesięcy z powodu limfopenii i nieprawidłowości w badaniu cytometrycznym subpopulacji limfocytów. W momencie postawienia diagnozy u pacjenta stwierdzono liczne zakażenia oportunistyczne (zakażenie cytomegalowirusowe, zapalenie płuc wywołane przez *Pneumocystis jiroveci* i *Absidia pneumoniae*) oraz zaawansowane zmiany zanikowe w ośrodkowym układzie nerwowym, widoczne w badaniu rezonansem magnetycznym mózgu [Rycina 1B]. Pomimo wdrożonej szybko diagnostyki, w tym genetycznej i leczenia pacjent zmarł w przebiegu objawów ogólnoustrojowej choroby metabolicznej i zakażenia oraz niewydolności krążeniowo-oddechowej, wymagającej wspomagania. Pacjent zmarł przed postawieniem diagnozy ADA-SCID i nie był leczony ETZ ani HSCT (Publikacja nr 6).

Infekcje wirusowe potwierdziliśmy u 4 pacjentów (57%): 2 miało infekcję cytomegalowirusową, 1 wirus RS (RSV), a 1 infekcję adenowirusową (ADV), 1 wirus ospy wietrznej i półpaśca (VZV) i opryszczkę zwykłą (HSV). Zakażenia grzybicze podejrzewano u 4 kolejnych pacjentów, poza pacjentem 3. U 3 pacjentów podejrzewano zakażenie grzybem Candida z powodu obecności metabolitów grzybów w surowicy (mannan lub beta-D-glukan), u 1 pacjenta podejrzewano zakażenie grzybem *Aspergillus* (galaktomannan w surowicy), a u 2 pacjentów zakażenie *Pneumocystis jiroveci* (dodatnie swoiste IgG, zdjęcie rentgenowskie klatki piersiowej). Miejscowe powikłanie BCG obserwowano u 3 pacjentów. U 2 z nich miejscowy odczyn w miejscu szczepienia bez limfadenopatii rozwinęło się między 3. dniem a 4. tygodniem od rozpoczęcia wstępnej ETZ. U P5 pierwsze objawy powikłania BCG

zaobserwowano po 4 tygodniach ETZ i ustąpiły po rozpoczęciu leczenia dwoma lekami przeciwgruźliczymi: izoniazydem i ryfampicyną [Rycina 2].

U wszystkich pacjentów liczba limfocytów T (zarówno CD4+ jak i CD8+), limfocytów B i komórek NK była poniżej wartości referencyjnych dla wieku i rozpoznano SCID T-B-NK- [Tabela 5]. Stężenie immunoglobulin klasy G było obniżone u 2 pacjentów, a klasy IgM u 3 pacjentów. Diagnoza ADA-SCID była stwierdzona na podstawie aktywności ADA w erytrocytach (4 pacjentów) i/lub badania genetycznego (warianty patogenne stwierdzono u 6 pacjentów). Aktywność ADA w krwinkach czerwonych była bardzo niska u 3 pacjentów (<1%) i niska (4,9%) u jednego pacjenta, którego badano 5 dni po transfuzji koncentratu krwinek czerwonych [Tabela 5]. Testy genetyczne wykazały obecność 7 wariantów u 6 pacjentów. Najczęstszy wariant (c.302G> A) wykryty u 3 pacjentów: w P3 i P4 w układzie homozygotycznym, a u P5 heterozygotycznym. Następny najczęstszy wariant (c.956_960delAAGAG) wykryto u 2 pacjentów (P5, P7) w układzie heterozygotycznym. U pozostałych pacjentów wykryto inne warianty [Tabela 5]. U pacjenta P2 nie wykryto wariantów patogennych.

U 4 pacjentów Oddziału Immunologii IP-CZD przed HSCT stosowano ETZ obserwując normalizację liczby limfocytów oraz aktywności transaminaz [Rycina 3].

Procedurze HSCT było poddanych 6 pacjentów w latach 2010-2022. Wykonano MSD u 2 pacjentów, MUD u 3 pacjentów, u 1 podano komórki macierzyste od haploidentycznego dawcy rodzinnego. Wszyscy pacjenci żyją, 1 pacjent zmarł przed kwalifikacją do HSCT. Schematy leczenia kondycjonującego w 5 przypadkach zastosowano zgodnie z obowiązującymi zaleceniami Europejskiego Towarzystwa Niedoborów Odporności (The European Society for Immunodeficiencies - ESID). W dwóch przypadkach schemat leczenia obejmował treosulfan, fludarabinę i tiotepę.

Żaden z pacjentów nie został skierowany na terapię genową (TG), która jest dostępna w Europie tylko w dwóch ośrodkach: w San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy w Mediolanie z użyciem wektora retrowirusowego oraz w Great Ormond Street Hospital w Londynie z użyciem wektora lentiwirusowego w ramach badań klinicznych. Zgodnie z polskimi przepisami pacjent powinien uzyskać zgodę Narodowego Funduszu Zdrowia na takie leczenie. Spośród czterech pacjentów IPCZD zakwalifikowanych do leczenia docelowego jeden miał MSD w okresie braku dostępności do TG, rodzice kolejnego wyrazili początkowo zgodę na TG, jednak ostatecznie odmówili z powodu skomplikowanej sytuacji rodzinnej. Dwóch innych pacjentów zdecydowało się na HSCT.

Dyskusja

Rozpoznanie ADA-SCID było stawiane dość szybko, a podejrzenie SCID było wysuwane z powodu zapalenia płuc z towarzyszącą leukopenią. Późniejsze rozpoznanie pacjentów P1 i P2 wynikało zapewne z ich łagodniejszego fenotypu atypowego SCID. Trzeba zwrócić uwagę, że zmiany w płucach obserwowane w badaniach obrazowych mogły być nie tylko wynikiem zapalenia płuc, ale również proteinozy płuc często obserwowanej u pacjentów z ADA-SCID [32]. Nie wykonywano biopsji płuc ani popłuczyn z drzewa oskrzelowo-pęcherzykowego, które mogłyby potwierdzić takie rozpoznanie. Obserwowano poprawę po leczeniu ETZ, z ustąpieniem duszności lub odstawieniem tlenoterapii u dwóch pacjentów (P5, P6). Zgodnie z literaturą ustąpienie objawów proteinozy płuc opisywane jest po ETZ lub HSCT [32]. W badaniu radiologicznym klatki piersiowej u niemowląt z nawracającymi i trudno leczącymi się zapaleniami płuc należy zwracać uwagę na cechy dysplazji kostnej takie jak ostry kąt łopatki czy poszerzenia połączeń chrzestno-kostnych żeber, mogących nasunąć podejrzenie ADA-SCID [33]. W naszej grupie pacjentów, objaw ten stwierdzono u 2 pacjentów dopiero po retrospektywnej analizie badań.

Hipertransaminazemię obserwowano u 71% pacjentów. U pacjenta P5 stwierdzono znaczny wzrost aktywności transaminaz w okresie poprzedzającym rozpoczęcie ETZ. U pacjentów z ADA-SCID niewydolność wątroby może mieć piorunujący przebieg [34]. U naszej pacjentki po rozpoczęciu ETZ uzyskano znaczącą poprawę [Rycina 3].

Kolejnym wyzwaniem w badanej grupie było właściwe ukierunkowanie diagnostyki u pacjentów z nietypowymi objawami. U pacjenta P3, nawracająca biegunka od pierwszego miesiąca życia, brak rozwoju i opóźniony rozwój psychomotoryczny czy zakażenia VZV (w wieku 3 miesięcy) i HSV (w wieku 9 miesięcy) nie skłoniły do diagnostyki immunologicznej prawdopodobnie z powodu dominujących wówczas objawów nefrologicznych: rozpoznano atypowy zespół hemolityczno-mocznicowy (aHUS) z niewydolnością oddechową, i koniecznością dializoterapii i plazmaferezy. Rozpoznanie SCID postawiono, kiedy pacjent miał już objawy niewydolności wielonarządowej, zaawansowane zmiany zanikowe w ośrodkowym układzie nerwowym, ciężkie nadciśnienie tętnicze, zakażenie cytomegalowirusem oraz zapalenie płuc wywołane przez *Pneumocystis jiroveci* i *Absidia sp*. Rozpoznanie ADA-SCID ustalono pośmiertnie (Publikacja 6).

Innym problemem jest zakażenie prątkiem szczepionkowym BCG u pacjentów z IEI [11]. W Polsce szczepienie przeciwko gruźlicy jest obowiązkowe w pierwszych dwóch dniach życia u wszystkich noworodków, u których nie ma przeciwskazań. Poważne powikłania

obserwuje się u pacjentów ze SCID oraz z mendlowską podatnością na choroby mykobakteryjne (Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease - MSMD). Uważa się, że komórki NK odgrywają rolę ochronną prawdopodobnie ze względu na produkcję IFN-γ (Publikacja 3). Jednak żaden z naszych pacjentów z ADA-SCID nie rozwinął rozsianej choroby BCG, a miejscowe zakażenie obserwowano u 3 pacjentów, jednego przed ETZ i dwóch po rozpoczęciu ETZ wraz ze wzrostem liczby limfocytów. Pacjenci ci byli leczeni dwulekową terapią przeciwmykobakteryjną (izoniazyd, ryfampicyna) [Rycina 2; Tabela 6].

Obecnie diagnostyka ADA-SCID w Polsce jest dość łatwo dostępna i niedroga. W przypadkach, gdy typowym objawom klinicznym towarzyszą nieprawidłowe wyniki cytometrii przepływowej sugerujące rozpoznanie ADA-SCID, oceniana jest aktywność enzymu ADA w krwinkach czerwonych, a potwierdzeniem jest badanie genetyczne. Przed 2010 rokiem z różnych przyczyn opóźnienie w procesie diagnostycznym było zdecydowanie większe, co często prowadziło do poważnych powikłań, jak w przypadku pierwszych pacjentów z opisywanej grupy, zdiagnozowanych w wieku od 16 do 27 miesięcy, lub do zgonu bez rozpoznania. Dokładna liczba pacjentów z ADA-SCID w Polsce pozostaje nieznana. Częstość występowania ADA-SCID wśród wszystkich SCID zdiagnozowanych w latach 2010-2022 wyniosła 10,9%. Według raportów Głównego Urzędu Statystycznego w tym okresie odnotowywano rocznie 50-88 zgonów niemowląt z powodu różnych zakażeń (Archiwum na stronie: https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/roczniki-statystyczne/roczniki-statystyczne/rocznik-demograficzny-2021,3,15.html). Nie można wykluczyć, że wśród nich byli niezdiagnozowani pacjenci ze SCID. Program badań przesiewowych noworodków w kierunku SCID umożliwi identyfikację takich niemowląt.

Leczeniem pierwszego wyboru ADA-SCID jest HSCT u dzieci, które mają zgodne pod względem HLA rodzeństwo [35]. Według danych z 16 ośrodków wykonujących HSCT w latach 1981-2009 wskaźnik przeżycia w ADA-SCID zależy od rodzaju HSCT i wynosi 86% dla MSD, 81% dla MFD, 66% dla MUD i 43% dla Haplo [36]. Ostatnie badania na dużych grupach pacjentów: 131 ADA-SCID zdiagnozowanych w latach 1982-2017 [37] i 152 pacjentów ze SCID, w tym 43 ADA-SCID leczonych w 2006-2014 [38], wykazały wyższe przeżycie u pacjentów przeszczepionych od zgodnych dawców rodzinnych (MSD/MFD) w wieku poniżej 3,5 miesiąca i bez aktywnych infekcji. W przypadku braku zgodnego dawcy rodzinnego według Europejskiego Towarzystwa Niedoborów Odporności (ESID), Europejskiego Towarzystwa Transplantacji Krwi i Szpiku (EBMT) i Europejskiej Sieci Referencyjnej ds. Rzadkich Pierwotnych Niedoborów Odporności (ERN-RITA), należy rozważyć terapię genową [39]. Ta procedura nie wymaga poszukiwania dawcy i wiąże się

z niższą częstością występowania powikłań, w tym braku choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) i śmiertelności związanej z zabiegiem. Dostępność terapii genowej w ADA-SCID ma ograniczenia. Procedura wykonywana jest wyłącznie w 1 ośrodku zagranicznym, wymaga zgody na finansowanie ze środków publicznych oraz ETZ do czasu TG. Dodatkowymi minusami są dłuższy czas trwania procedury i czas potrzebny do osiągnięcia rekonstytucji immunologicznej. Częstotliwość niepowodzenia terapii jest podobna: 10-20% w MSD HSCT i 5-20% w TG, ale śmiertelność związana z procedurą wynosi odpowiednio 5,6 i 0% [35]. Niektórzy autorzy zalecają rozważenie TG jako leczenia pierwszego rzutu, nawet jeśli dostępny jest zgodny dawca rodzinny, ponieważ ta procedura eliminuje jakiekolwiek ryzyko alloreaktywności [40]. Jednak od czasu wprowadzenia kondycjonowania opartego na treosulfanie w niektórych ośrodkach wyniki dla MUD i Haplo HSCT są porównywalne z MSD i dlatego te procedury są zalecane, gdy nie ma dostępu do TG [41].

ETZ jest skutecznym leczeniem, które jest stosowane od ponad 3 dekad. Należy ją wdrożyć jak najszybciej, aby ustabilizować ogólny stan pacjenta, usunąć z organizmu kumulujące się metabolity puryn, znormalizować aktywność aminotransferaz, a także leczyć proteinozę pęcherzyków płucnych. EZT jest zalecana jako terapia przejściowa przed leczeniem, takim jak TG lub HSCT, nawet jeśli taka terapia jest dostępna, aby poprawić stan pacjenta i zapobiec rozwojowi neuro- i hepatotoksyczności [34]. Zalecany czas trwania ETZ waha się od kilku miesięcy do około 2 lat, ponieważ ETZ wiąże się z kilkoma działaniami niepożądanymi, w tym rozwojem nowotworów złośliwych (chłoniaków związanych z EBV, głównie po 8-10 latach leczenia) i indukcji przeciwciał neutralizujących enzymy u około 10% pacjentów [8]. Wzrost liczby limfocytów B jest widoczny w ciągu pierwszego miesiąca leczenia, a w limfocytach T po 2-4 miesiącach [42], co zaobserwowano u naszych pacjentów. Koszty leku i brak refundacji z powodu braku rejestracji leku w Polsce i Unii Europejskiej są głównymi przeszkodami w prowadzeniu ETZ i skutkuje ograniczoną liczbą i czasem leczenia pacjentów.

IX.3. Wyniki i dyskusja publikacji numer 3

W pracy pt. „BCG Moreau vaccine safety profile and NK cells-double protection against disseminated BCG infection in retrospective study of BCG vaccination in 52 Polish children with severe combined immunodeficiency" oceniono przebieg kliniczny rozsianego zakażenia BCG u 52 zaszczepionych pacjentów ze SCID hospitalizowanych w IPCZD w Warszawie oraz porównano z przebiegiem klinicznym pacjentów biorących udział w badaniu Marciano i wsp. [11].

Spośród 52 dzieci z rozpoznaniem SCID, zaszczepionych szczepionką BCG, u dwanaściorga wystąpiły odczyny miejscowe. Natomiast rozsiane zakażenie BCG zdiagnozowano u 10 pacjentów z fenotypem SCID B+NK-: u 6 z wariantem patogennym w genie *IL2RG,* u jednego pacjenta z niedoborem *JAK3* i u 3 o nieznanym podłożu genetycznym. Rozsiane zakażenie BCG nie występowało w grupie pacjentów SCID B-NK+, w tym u 16 pacjentów z *RAG1/*2, po 2 pacjentów z patogennymi wariantami w *IL7RA* i Artemis (*DLCRE1C*), po 1 pacjencie każdy z *MHC II, ZAP-70* i Cernunnos (*NHEJ1*) oraz u 10 pacjentów z nieznanym podłożem molekularnym. Wśród pacjentów ze SCID, klinicznym objawem rozsianego zakażenia BCG było: zapalenie opon mózgowych (1 pacjent), zapalenie oskrzeli i płuc (4 pacjentów), rozsiane zakażenie skóry (3 pacjentów), pojedynczy ropień skóry (2 pacjentów), zapalenie kości i/lub złamania patologiczne (6 pacjentów), nacieki w śledzionie i ropień wątroby (5 pacjentów). Nie zaobserwowano ropnia mózgu, zapalenia węzłów chłonnych ani innych lokalizacji zakażenia BCG. Zakażenie potwierdzono dodatnią reakcją łańcuchową polimerazy (PCR) w kierunku *Mycobacterium tuberculosis* complex i hodowlą u 8 z 10 pacjentów. Zgodnie z kryteriami diagnostycznymi rozsianego zakażenia BCG, możliwe rozpoznanie rozsianego zakażenia BCG ustalono u dwóch pacjentów z objawami klinicznymi i typowymi zmianami histopatologicznymi z rozpoznaniem tworzenia się ziarniniaków. U trojga niemowląt rozpoznanie SCID ustalono przed 1985 r., kiedy przyjęto je w stadium terminalnym na oddział intensywnej terapii. Dwoje z nich zmarło wkrótce w przebiegu niewydolności wielonarządowej, badanie pośmiertne wykazało ziarniniaki. Trzeci pacjent, z dodatnim wywiadem rodzinnym, przyjęty z powodu niewydolności oddechowej i hepatosplenomegalii, z dodatnim wynikiem popłuczyn oskrzelowo-płucnych w kierunku *Mycobacterium tuberculosis* complex metodą PCR oraz hodowlą, zmarł po 4 miesiącach, pomimo podania 5 leków przeciwgruźliczych. Rozsiane zakażenia BCG u 10 (19%) pacjentów ze SCID hospitalizowanych w IPCZD stanowiły istotnie niższy wynik w porównaniu z 119 (34%) w badaniu Marciano (p =0,0028). Jednak odsetek pacjentów

SCID z miejscowym odczynem BCG był wyższy: 12 (24%) pacjentów w IPCZD, w porównaniu z 60 (17%) (p = 0,2417) w badaniu Marciano. Śmiertelność spowodowana powikłaniami związanymi z BCG w kohorcie Marciano była nieznacznie wyższa: 46 (13%) zgonów z 349 (p = 0,1724). W kohorcie IPCZD 3 (5%) zgony miały miejsce przed 1985 rokiem. Mediana bezwzględnej liczby komórek T w momencie rozpoznania SCID u pacjentów z rozsianymi powikłaniami związanymi z BCG okazała się nieistotna (p = 0,0915), podczas gdy bezwzględna liczba komórek B była istotnie wyższa (p = 0,0126), a liczba komórek NK istotnie niższa (p = 0,0161) w grupie z powikłaniami BCG w badaniu IPCZD. Rozsiane powikłania związane z BCG w badaniu IPCZD stwierdzono tylko u pacjentów SCID z niską liczbą komórek NK (p < 0,000001), w obu grupach obserwowano powikłania zlokalizowane; nieistotnie wyższe u pacjentów SCID NK+ (p = 0,4859). Pacjenci z zakażeniem miejscowym byli leczeni terapią dwulekową (izoniazyd i ryfampicyna), a z rozsianym zakażeniem BCG za pomocą 4 lub 5 leków przeciwgruźliczych (izoniazyd, ryfampicyna, etambutol, cyprofloksacyna i aminoglikozyd), skutecznie u 7 z 10 dzieci. Leczenie przeciwprątkowe zostało zakończone w ciągu 8–15 miesięcy, co zbiegło się z rekonstytucją immunologiczną. U 2 pacjentów miejscowa i rozsiana reaktywacja BCG nastąpiła w ciągu 3 miesięcy od HSCT.

Dyskusja

Wiele publikacji na temat powikłań związanych ze szczepieniem BCG u pacjentów ze SCID, odzwierciedla różnice w reaktogenności różnych szczepionek BCG wytwarzanych z różnych podszczepów. Badania francuskie (szczep BCG *Pasteura*), kanadyjskie (BCG *Pasteura Merieux Connaught*), chińskie (lokalnie produkowanymi szczepionkami, otrzymanymi od czterech różnych producentów) [43-46] wskazują na śmiertelne powikłania poszczepienne u dzieci ze SCID. Szczepionka BCG podszczep *Moreau* stosowana w produkcji szczepionek w Polsce pochodzi od podszczepu *Mycobacterium bovis BCG Moreau Rio de Janeiro* [47–50]. Retrospektywne badanie dużej kohorty brazylijskich pacjentów ze SCID zaszczepionych po urodzeniu szczepionką BCG *Moreau/Rio de Janeiro* produkowaną w Brazylii wykazało, że 29 spośród 60 (48,3%) pacjentów ze SCID zaszczepionych szczepionką BCG, miało rozsiane zakażenie BCG [51], natomiast w naszym badaniu rozsiane zakażenie BCG zaobserwowano tylko u 10 (19%) z 52 pacjentów ze SCID zaszczepionych polską szczepionką. Podszczepy szczepionki BCG otrzymano w wyniku zmian genetycznych, które wystąpiły podczas namnażania podszczepów w różnych krajach. Przez ponad 50 lat produkcji szczepionki BCG *Moreau* w Polsce, z jej potwierdzonymi zmianami genetycznymi,

udowodniono, że posiada ona dobrze udokumentowany profil bezpieczeństwa, w porównaniu z podszczepem macierzystym BCG z *Rio de Janeiro* oraz podszczepami *Danish* i *Pasteur* [47–50, 52, 53]. Powikłania BCG stanowią poważny problem zdrowotny u wszystkich pacjentów ze SCID na całym świecie i są wskazaniem do natychmiastowego leczenia przeciwgruźliczego i wykonania HSCT. Wczesna diagnoza objawów ma kluczowe znaczenie; bez diagnozy i wdrożenia odpowiedniego leczenia, rozsiana choroba BCG może być przyczyną zgonu. Praktycznym zaleceniem wynikającym z naszych obserwacji jest nieprzerywanie leczenia przeciwgruźliczego w okresie po przeszczepieniu, pomimo wzrastających parametrów odporności komórkowej.

Odpowiedź immunologiczna na zakażenie *Mycobacterium tuberculosis* obejmuje złożony proces komórkowy, który nie jest w pełni poznany. Ochrona przed rozsianą chorobą u dzieci jest związana z odpowiedzią typu Th1, obejmującą limfocyty T CD4+, które produkują interferon gamma (IFN-γ). Badanie przeprowadzone przez Marciano i in. ujawniło, że niższa liczba limfocytów T u pacjentów z SCID zwiększała prawdopodobieństwo wystąpienia u nich powikłań związanych ze szczepieniem BCG. W naszym badaniu liczba limfocytów T nie miała wpływu na występowanie rozsianego BCG. Liczba limfocytów B w SCID nie odgrywa roli w obronie przed patogenami, ponieważ limfocyty B, jeśli są obecne, nie wytwarzają przeciwciał [54]. Komórki NK mogą stanowić główne źródło produkcji IFN-γ podczas ekspozycji na podszczep *Mycobacterium bovis BCG* i tym samym przyczyniać się do nieswoistych korzystnych efektów szczepienia BCG [55]. Monocyty są prawdopodobnie głównymi producentami IL-12, a komórki NK i T - IFN-γ [56]. Produkcja IFN-γ jest główną funkcją komórek NK, ma również korzyści immunoterapeutyczne przeciwko nowotworom złośliwym obserwowane w przypadku szczepienia *Mycobacterium bovis BCG* [57]. Wykazano również, że ponowne szczepienie BCG dorosłych z utajonym zakażeniem *Mycobacterium tuberculosis* indukuje długotrwałą odpowiedź komórek NK reaktywnych na BCG [52]. Badanie naszych 18 pacjentów z SCID RAG1 i RAG2 oraz B-NK+ wykazało, że obecność komórek NK może zapewnić obronę przed rozwojem rozsianego zakażenia BCG. W naszym badaniu rozsiane zakażenie BCG obserwowano tylko u pacjentów ze SCID T-B+NK-: z wariantami w genach *IL2RG* i *JAK3*. Nasze obserwacje pokazują, że wyższa liczba komórek NK zapewnia istotną statystycznie ochronę przed rozsianym zakażeniem BCG u wszystkich pacjentów ze SCID.

IX.4. Wyniki i dyskusja publikacji numer 4

W pracy pt. „The clinical and genetic spectrum of 82 patients with RAG deficiency including a c.256_257delAA founder variant in Slavic countries "w grupie 82 pacjentów z deficytem RAG stwierdzono fenotypy SCID typowe (n = 20), atypowe (n = 21), zespół Omenna (n = 37) oraz CID (n=4). Sześćdziesięciu siedmiu (81,7%) pacjentów było nosicielami *RAG1*, a 15 pacjentów (18,3%) miało bialleliczne warianty w genie *RAG2*. Szacuje się, że minimalna roczna częstość występowania niedoboru RAG w krajach słowiańskich waha się od 1 na 180 000 do 1 na 300 000 żywych urodzeń. W kohorcie pacjentów z wariantami *RAG1* 70% (n = 47) było nosicielami allelu c.256_257delAA w układzie homozygotycznym (n = 18, 27%) lub heterozygoty złożonej (n = 29, 43%). Większość (77%) pacjentów z homozygotycznym wariantem *RAG1* c.256_257delAA pochodziła z dorzecza Wisły w środkowo-wschodniej Polsce, a przypadki złożonej heterozygoty występowały we wszystkich krajach słowiańskich z wyjątkiem Bułgarii. Obraz kliniczny i immunologiczny pacjentów z wariantem homozygotycznym c.256_257delAA genu *RAG1* był bardzo zróżnicowany (SCID typowy, atypowy, zespół Omenna).

Retrospektywna analiza 82 pacjentów z niedoborem RAG z 67 rodzin w 12 krajach, urodzonych w okresie 1992–2018 wykazała równomierny rozkład płci: mężczyźni (n = 40, 49%) i kobiety (n = 42, 51%). Mediana wieku w chwili rozpoznania RAG wynosiła 1,3 roku (zakres od 1 dnia do 24 lat). W momencie wysłania publikacji (marzec 2020 r.) 43 z 82 pacjentów zmarło (52%), 8 z 43 po HSCT (19%). Wszyscy żyjący pacjenci mieli HSCT (w wieku od 1 do 18 lat), z wyjątkiem trzech kobiet z objawami CID z Polski (P42), Bułgarii (P54) i Czech (P55), które żyją bez przeszczepienia w wieku 3, 6 i 25 lat. Największą grupę pacjentów (n = 40, 48,8%) stanowili Słowianie zachodni z Polski (n = 29, n = 1 z Litwy, pochodzenia polskiego), Czech (n = 8) i Słowacji (n = 2). Drugą co do wielkości grupę stanowili Słowianie wschodni (n = 30, 36,5%) z Rosji (n = 24), Ukrainy (n = 4) i Białorusi (n = 2). Najmniejszą grupę stanowili Słowianie Południowi (n = 12, 14,6%) z Serbii (n = 6), Słowenii (n = 3), Chorwacji (n = 1), Czarnogóry (n = 1) i Bułgarii (n = 1).

Warianty patogenne w genie *RAG1* wykryto u 67 pacjentów (82%), a w *RAG2* u 15 pacjentów (18%). Dla wariantów *RAG1* dziewiętnaścioro dzieci (23%) było homozygotami, a 47 pacjentów (57%) heterozygotami złożonymi, dla wariantów RAG2 odpowiednio 8 dzieci (10%) i 7 pacjentów (9%). Fenotypy kliniczne obejmowały typowy SCID (n = 20), OS (n =

37), AS (n = 21) oraz CID (n = 4). Zgodnie z oczekiwaniami, grupa AS miała zwiększoną częstość występowania cytopenii autoimmunizacyjnych i wywiad zakażeń wirusem opryszczki.

Pacjenci z wariantami *RAG1* najczęściej mieli OS (46%) (31 dzieci), następnie AS (28%) (19 pacjentów), TS (19%) (13 pacjentów) i CID (6%) (4 pacjentów). Pacjenci zdiagnozowani jako mający OS i TS charakteryzowali się klasycznym fenotypem klinicznym i immunologicznym i mieli postawioną diagnozę przed ukończeniem 1 roku życia. Z drugiej strony, mediana wieku w momencie rozpoznania AS i CID wynosiła 4 lata (± 6,02 roku) i wahała się od 5 miesięcy do 24 lat. W grupie AS wśród powikłań infekcyjnych najczęściej występowało zakażenie CMV (n = 9, 42%). Wśród pacjentów, którzy otrzymali szczepienie BCG, tylko u części (4 z 18, 22%) rozwinęło się zakażenie BCG [Rycina 4]. Objawy autoimmunizacyjne w grupie AS i CID obserwowano odpowiednio u 12/19 i 4/4 pacjentów, przy czym cytopenia autoimmunizacyjna była najczęstsza w AS (n = 11/19, 58%), w tym autoimmunizacyjna niedokrwistość hemolityczna (n = 8), izolowana trombocytopenia immunologiczna (ITP) (n = 2) i wieloliniowa cytopenia (n = 2). Nieswoiste zapalenie jelita grubego rozpoznano u 9% (2/19) pacjentów z AS z autoimmunizacją. W grupie CID u jednego pacjenta wystąpił ziarniniak skóry, u jednego rozwinęło się zapalenie naczyń, a u jednego bielactwo [Rycina 4B]. Co ciekawe, wysoki odsetek pacjentów miał obecne limfocyty B (>65% u 13 z 19 pacjentów) w momencie rozpoznania. Jednak u 2 z 7 (28%) pacjentów stwierdzono całkowity brak KREC. Sugeruje to nieprawidłowe dojrzewanie limfocytów B, nawet przy zachowanej frakcji całkowitej liczby limfocytów B. U czterech pacjentów występował prawidłowy poziom IgG, a u jednego w wieku 4 lat stwierdzono niedobór IgA, który z wiekiem przekształcił się w agammaglobulinemię.

W niniejszym badaniu dodatkowo określiliśmy aktywność rekombinacyjną białek RAG1/RAG2 u pacjentów. Spośród wariantów *RAG*, 38 wariantów było unikatowych, w tym warianty z przesunięciem ramki odczytu (n = 7), nonsensowne (n = 4) i zmiany sensu (n = 27), a 23 warianty w *RAG1* były nowe w naszej kohorcie i dla wszystkich z nich określono aktywność rekombinacyjną. Delecja wystąpiła w jednym lub obu allelach u 22 z 30 pacjentów z OS, u 7 z 13 pacjentów z TS i u 16 z 19 pacjentów z AS i fenotypem 2/4 CID. Ze względu na obecność wariantu c.256_257delAA (p.K86Vfs∗33) we wszystkich kohortach, obliczyliśmy częstość występowania tego allelu wśród pacjentów ze Słowian wschodnich, zachodnich i południowych [Rycina 5A–F]. Dziewięć rodzin miało dwoje lub troje dzieci z niedoborem odporności, dlatego przeprowadziliśmy oddzielną analizę rodzin i przeanalizowaliśmy częstość występowania między krajami, licząc jeden przypadek na

rodzinę. Pacjenci pochodzenia południowo- i zachodniosłowiańskiego wykazali najwyższą częstość występowania allelu c.256_257delAA [Rycina 5C,E]. Przeanalizowaliśmy względną częstość występowania tego dominującego allelu wśród pacjentów i rodzin słowiańskich. Różnice w częstości występowania allelu c.256_257delAA wśród pacjentów ($\chi 2$ = 8,4; p = 0,015) i rodzin ($\chi 2$ = 22,8; p < 0,0001) Słowian wschodnich/zachodnich/południowych okazały się istotne statystycznie. Populacja Słowian zachodnich miała wyższą względną częstość występowania tego allelu niż populacja Słowian wschodnich (rodziny p = 0,0006; pacjenci p = 0,006), ale nie różniła się od populacji Słowian południowych (rodziny p = 0,14; pacjenci p = 0,81). Oprócz analizy różnych kohort Słowian, obliczyliśmy wkład każdego kraju w ogólną częstość występowania allelu *RAG1* c.256_257delAA i wykazaliśmy najwyższe występowanie w Polsce [Rycina 5D]. Allel *RAG1* c.256_257delAA (p.K86Vfs∗33) był obecny u ponad 50% pacjentów z niedoborem RAG1 z Serbii, Słowenii, Czarnogóry i Chorwacji, ale nie można ekstrapolować tego odkrycia na całą populację południowosłowiańską, ponieważ tylko jeden pacjent pochodził z Chorwacji i Czarnogóry [Rycina 5F]. Wśród Słowian wschodnich i południowych zaobserwowaliśmy tylko dwie rodziny (jedną z Ukrainy i jedną z Serbii), u których wykryto c.256_257delAA w układzie homozygotycznym, ale pokrewieństwo potwierdzono tylko u pacjentów serbskich. Polska kohorta rodzin wykazała 12 homozygotycznych genotypów wśród 18 rodzin z dodatnim wynikiem w *RAG1* z tylko trzema przypadkami udowodnionego pokrewieństwa. Ze względu na wysoką częstość występowania wariantu *RAG1* c.256_257delAA w Polsce w układach homozygotycznych, zbadaliśmy jego geograficzne rozmieszczenie w populacjach Słowian zachodnich, wschodnich i południowych. Nasze odkrycia zilustrowano na mapie Europy Wschodniej i Federacji Rosyjskiej, w oparciu o miejsce pochodzenia pacjenta (jeden pacjent z każdej rodziny) [Rycina 6]. Zbadaliśmy rozmieszczenie wariantu *RAG1* c.256_257delAA w 11 z 13 słowiańskich grup etnicznych i był on szeroko rozpowszechniony i występował w 10 z 11 krajów z wyjątkiem Bułgarii [Rycina 6]. Występowanie wariantu c.256_257delAA obserwowano od Lublany (Słowenia) na zachodzie do Władywostoku na wschodzie oraz od Moskwy na północy do Cetyni (Czarnogóra) na południu [Ryciny 6 i 7]. Geograficzne centrum przypuszczalnego pochodzenia wariantu *RAG1* c.256_257delAA odpowiada obszarowi dorzecza Wisły w środkowo-wschodniej w Polsce, w którym wariant ten występował najczęściej [Rycina 6B] i sugerował wspólne pochodzenie alleli c.256_257delAA we wszystkich populacjach słowiańskich. Ze względu na niewielką liczbę przypadków nie udało się określić stopniowego spadku częstości występowania c.256_257delAA wśród Słowian wschodnich i południowych, ale wyraźnie wykazano, że rodziny heterozygotyczne są

rozprzestrzenione w innych krajach słowiańskich [Rycina 6]. W naszej kohorcie większość pacjentów z Rosji (11/19) jest skoncentrowana na terenach na zachód od Uralu, ale 8 pacjentów z 5 rodzin urodziło się na Syberii i rosyjskim Dalekim Wschodzie i wszyscy odziedziczyli badany przez nas wariant [Rycina 7]. Odkrycie to nie przeczy naszemu założeniu, że wariant c.256_257delAA ma pochodzenie słowiańskie. Zgodnie z mapą przesiedleń ludności w Rosji, większość Rosjan mieszka w centralnej części lub na południowym i północnym zachodzie Rosji, a także na Uralu. Na wschód od Uralu Rosjanie mieszkają głównie w pobliżu południowej granicy Rosji, co pokazano na rycinie 6 i 7 jako jasnoszary obszar na białej mapie Federacji Rosyjskiej.

Pacjentów z wariantami patogennymi w genie *RAG2* wykryto tylko w trzech krajach: zachodnich (Polska i Czechy) oraz wschodnich Słowian (Rosja). Spośród 15 pacjentów 7 prezentowało TS, 6 OS, i 2 AS. Dwie Polki objawiały się jako AS/CID, a jedna miała siostrę ze TS. Dziewczynki z późną manifestacją wariantu *RAG2* prezentowały zapalenie mózgu, HSV, zapalenie oskrzeli, zapalenie płuc, neutropenię i zapalenie płuc, miejscowe zakażenie BCG i zahamowanie rozwoju. Co ciekawe, uzyskane dane wykazały, że 53% (8/15) pacjentów miało homozygotyczne warianty w genie *RAG2*, ale pokrewieństwo ustalono tylko w jednym wywiadzie rodzinnym. Pomimo znacznej różnorodności genotypów, występują pewne powtarzające się warianty, c.1300T>C u dzieci rosyjskich, c.686G>A u dzieci polskich i czeskich (w układzie homo i heterozygotycznym) oraz c.1357T>C tylko u pacjentów polskich. Jednak oczywisty dominujący region wśród wariantów nie został ustalony ze względu na niewielką liczbę badanych przypadków. Warianty *RAG2* w kohorcie słowiańskiej wykazały szeroki zakres aktywności rekombinacyjnej. Warianty związane z TS i OS wykazywały niższą aktywność niż te wykryte u pacjentów z atypowymi objawami SCID. Nasze dane potwierdzają korelację genotypu i fenotypu w niedoborze RAG2 u dzieci słowiańskich [58].

Przeanalizowaliśmy częstość występowania wszystkich typów niedoboru RAG łącznie (genotyp *RAG1/RAG2*; fenotyp OS/TS/AS/CID) w każdym kraju w różnych okresach. Średnia częstość występowania niedoborów RAG została obliczona na podstawie liczby wszystkich zdiagnozowanych pacjentów i ich potwierdzonego rodzeństwa oraz liczby żywych urodzeń w badanych krajach w okresie od roku pierwszego zarejestrowanego pacjenta w kraju do ostatniego [Tabela 7]. Średnia 10-letnia częstość występowania została oszacowana na podstawie liczby wszystkich pacjentów pochodzenia słowiańskiego zdiagnozowanych od 2008 do 2017 roku w każdym kraju. Uzyskane dane wykazały, że częstość występowania zdiagnozowanego niedoboru RAG wahała się od 1 na 75 000

w Słowenii do jednego na 1 100 000–1 600 000 żywych urodzeń w Rosji i na Ukrainie. Szeroki zakres częstości występowania w krajach słowiańskich sugeruje niedodiagnozowanie. Porównaliśmy dwie największe kohorty RAG z Rosji (n = 24) i Polski (n = 30). Polska jako największy kraj zachodniosłowiański, korzysta z zaawansowanej diagnostyki immunologicznej, a od 1999 r. co roku potwierdzano od jednego do trzech pacjentów [Rycina 8B].

Pomimo zwiększonej świadomości wariantów TS i OS i lepszego dostępu do HSCT w większości krajów słowiańskich, wskaźnik śmiertelności pacjentów z RAG jest nadal wysoki. Przebadaliśmy względny wskaźnik śmiertelności wśród grup OS/TS/CID pacjentów z niedoborem RAG [Rycina 8C-E]. Porównanie pacjentów po przeszczepieniu w dwóch grupach (Słowian wschodnich i zachodnich) jako największych kohort nie wykazało żadnej statystycznie istotnej różnicy w przeżyciu [Rycina 8F]. Dodatkowo porównaliśmy wyniki HSCT przed i po 2011 roku, ze względu na zmianę protokołów w ostatnich latach i wykazaliśmy, że przeżywalność pacjentów ze Słowian wschodnich znacznie się poprawiła po 2011 roku i osiągnęła ten sam odsetek, co u Słowian zachodnich (Rysunki 8G, H). Sugerujemy, że słabe wyniki HSCT przed 2011 rokiem (trzech na pięciu pacjentów zmarło po HSCT) u Słowian Wschodnich wynikały z opóźnionej diagnozy u pacjentów z AS/CID i towarzyszących powikłań (przewlekłe infekcje i dysregulacja immunologiczna). Wyższe wskaźniki przeżycia mieli pacjenci z OS i TS [Rycina 9].

Dyskusja

Opublikowano kilka wieloośrodkowych badań kohortowych, a przegląd literatury podaje, że liczba opublikowanych przypadków niedoboru RAG przekracza 400 [59-64]. Wśród populacji o wysokim wskaźniku pokrewieństwa, warianty założycielskie genów *RAG* zaproponowano u Amiszów i na Bliskim Wschodzie [65-67]. W niniejszym badaniu przedstawiamy największą, zdefiniowaną geograficznie kohortę pacjentów z niedoborem RAG. Nasi pacjenci to głównie osoby pochodzenia słowiańskiego z 11 krajów europejskich, zgromadzeni retrospektywnie w okresie 27 lat (1992–2018). W badaniu pacjentów z *RAG1* c.256_257delAA potwierdziliśmy, że u pacjentów z identycznymi wariantami, nawet w obrębie tej samej rodziny, można stwierdzić różne fenotypy kliniczne. Badania rodzinne dla homozygotycznych *RAG1* c.1438A>G i *RAG2* c.1375A>C odnotowano również w małżeństwach spokrewnionych pochodzenia arabskiego [68-69]. Ponadto podobne, nietypowe wyniki odnotowano u pacjentów z *RAG1* c.519delT (p.E174SfsX27) [53]. Spośród wszystkich tych raportów, nasze badanie z udziałem 19 pacjentów z homozygotycznym

wariantem *RAG1* c.256_257delAA jest największym w literaturze badaniem obejmującym populację powiązaną geograficznie. Dane z kalifornijskich badań przesiewowych noworodków w kierunku SCID zidentyfikowały warianty *RAG1/2* w 28,6% przypadków TS/OS, z częstością występowania około 1:250 000 [70]. W populacjach z dominacją małżeństw spokrewnionych, niedobór RAG zdiagnozowano u 48% (21/44) tureckich [71] i 51% (19/37) irańskich pacjentów ze SCID [72]. Częstość występowania niedoboru RAG jest trudna do ustalenia ze względu na bardzo zmienny fenotyp, późny wiek ujawnienia się wariantów hipomorficznych i różny poziom możliwości diagnostycznych w różnych krajach [73]. Na podstawie danych przedstawionych w niniejszym badaniu ustaliliśmy, że minimalna częstość występowania niedoboru RAG wahała się od 1:189 000 w Czechach do 1:1 200 000 na Ukrainie; średnio 1 na 190 000–300 000 żywych noworodków. Nadal nie jest jasne czy wszystkich pacjentów z deficytem RAG i fenotypem AS/CID (z resztkową aktywnością rekombinacyjną) można wykryć za pomocą badań przesiewowych noworodków [5]. Nasze dane retrospektywne sugerują, że większość pacjentów z późnymi formami niedoboru RAG (CID) prawdopodobnie nie jest zauważona, ale wykrywalność pacjentów TS/OS jest całkiem dobra w większości krajów słowiańskich. Istnieje ogromna potrzeba wczesnej identyfikacji tych pacjentów, zanim wystąpią powikłania zakaźne i autoimmunizacyjne. Dostępność sekwencjonowania nowej generacji i dostęp do procedury HSCT umożliwia poprawę wyników leczenia w tej grupie. W niniejszym badaniu 27% pacjentów zostało sklasyfikowanych jako AS. Fenotyp ten został po raz pierwszy opisany przez Schuetza C. i wsp. w 2008 roku, którzy nazwali go „atypowym/nieszczelnym SCID". W ciągu ostatnich lat wzrasta świadomość występowania tych pacjentów [53, 59-61, 63, 69, 74-76]. Do charakterystycznych cech klinicznych należą powikłania zapalne i/lub autoimmunizacyjne. Cytopenie autoimmunizacyjne były najczęstszym objawem w naszej kohorcie i stwierdzono je u 58% (11/19 pacjentów z deficytem RAG1 i fenotypem AS). U jednej trzeciej pacjentów z defektem RAG1 nie stwierdzono bardzo niskiej liczby limfocytów B, a u ponad dwóch trzecich przypadków stwierdzono obecność limfocytów B od niskiej do prawidłowej.

Słowianie stanowią największą grupę etniczno-językową w Europie [77-78]. W 10 z 11 krajów większość pacjentów była nosicielami wariantu c.256_257delAA w genie *RAG1* w układzie homo- lub heterozygotycznym. Na podstawie naszych danych przedstawionych w tym badaniu ustaliliśmy, że geograficzne centrum pochodzenia tego specyficznego allelu *RAG1* odpowiada obszarowi dorzecza Wisły w środkowo-wschodniej Polsce [Rycina 6B].

Lokalizacja ojczyzny Słowian przed ich wielką ekspansją w V i VI wieku jest jednym z ważnych pytań historii Europy. Chociaż zakłada się, że prehistorycznie pierwotnym

siedliskiem Słowian była Azja, z której migrowali, aby zaludnić części Europy Wschodniej, debata dotycząca europejskiej ojczyzny Słowian wydaje się pozostawać nierozwiązana. Sformułowano różne teorie dotyczące geograficznego pochodzenia Słowian oparte na danych archeologicznych, antropologicznych i/lub językowych. Jedna z nich umiejscawia kolebkę Słowian w dorzeczu Wisły i Odry (obecnie Polska), inna lokalizuje ją w dorzeczu środkowego Dniepru (obecnie Ukraina) [71]. Uzyskane dane wzmacniają hipotezę, że Słowianie mogli rozprzestrzenić się z obszaru dorzecza Wisły ze względu na dużą liczbę rodzin z homozygotycznym wariantem z tego regionu [rysunek 3B]. Możliwe, że wariant ten można byłoby znaleźć w dorzeczu środkowego Dniepru, gdyby była wyższa wykrywalność przypadków RAG na Ukrainie. Jedyny homozygotyczny wariant wśród Słowian wschodnich znaleziono na Ukrainie (Odessa), a rodzice zaprzeczyli swojemu pokrewieństwu. Dane przedstawione w pracy wskazują, że c.256_257delAA można określić jako „słowiański" wariant *RAG1* lub wariant założycielski. Migracje populacji w Europie doprowadziły do rozprzestrzenienia się grup etnicznych, a w konsekwencji do mieszania genetycznego. Migracje, wraz z innymi czynnikami, również determinowały częstość występowania wariantów genetycznych wśród innych populacji [77-78]. Przeglądając opublikowane przypadki, ustaliliśmy, że pacjenci z homo- i heterozygotycznymi wariantami c.256_257delAA *RAG1* wykryto w kohortach europejskich [53, 59, 79-82]. Niedawne badanie wśród kohorty 44 pacjentów SCID w Turcji wykazało jednego pacjenta z wariantem c.256_257delAA w *RAG1* w układzie homozygotycznym [71], a w Austrii zdiagnozowano niemowlę SCID z chłoniakiem B-komórkowym wątroby z homozygotycznym wariantem c.256_257delAA [82]. Należy zauważyć, że we wszystkich tych poprzednich badaniach pochodzenie etniczne pacjentów nie zostało udokumentowane. Nasze badanie podkreśla, że wariant założycielski *RAG1* występuje szczególnie często w obszarze dorzecza Wisły. Ponieważ przypadki kumulują się w określonym regionie w Polsce, badania przesiewowe nosicieli patogennych wariantów *RAG* mogą mieć duże znaczenie i mogą być oferowane rodzicom. Nasze badanie podkreśla znaczenie regionu urodzenia i pochodzenia etnicznego w diagnostyce genetycznej.

IX.5. Opis przypadku i dyskusja publikacji numer 5

W publikacji pt. „Case report: severe combined immunodeficiency with ligase 1 deficiency and Omenn-like manifestation" opisano przypadek dziewczynki, która urodziła się w 35. tygodniu ciąży z pierwszej, niepowikłanej ciąży u 28-letniej matki. Urodzona siłami natury, z masą urodzeniową 1950 g została oceniona na 6 punktów w skali Apgar. Rodzice byli zdrowi, niespokrewnieni. Po porodzie u dziewczynki stwierdzono problemy z oddychaniem i hepatosplenomegalię. Badania krwi wykazały niedokrwistość makrocytarną od pierwszego dnia życia, ze stężeniem hemoglobiny 6,9 G/dl w dniu urodzenia [zakres normy dla wieku: 14,9-23,7 G/dl], średnią objętością krwinki czerwonej (MCV) 133 fL [N: 100-125 fL], trombocytopenią w pierwszym tygodniu życia (minimalna liczba płytek krwi $49x10^3/\mu l$) i limfopenią od trzeciego dnia życia (4-16%; $0,2\text{-}1,3x10^3/\mu l$). Z powodu niewydolności oddechowej, prawdopodobnie nieinfekcyjnej, stosowano wentylację mechaniczną przez jeden dzień, następnie ciągłe dodatnie ciśnienie w drogach oddechowych przez nos przez kolejne 3 dni. Markery zakażenia i diagnostyka mikrobiologiczna były ujemne, ale u noworodka zastosowano empiryczną antybiotykoterapię (ampicyliną i amikacyna). Z powodu niedokrwistości, dziecko otrzymało wielokrotne transfuzje uzupełniające koncentratu krwinek czerwonych napromieniowanych, filtrowanych oraz 10 dawek erytropoetyny. Z powodu trombocytopenii jednorazowo przetoczono koncentrat płytek krwi. Dwukrotnie przetoczono dożylny preparat immunoglobulin. Dziewczynka została wypisana z oddziału noworodkowego w wieku 32 dni, ale po tygodniu, w wieku 5 tygodni, została ponownie przyjęta do szpitala z powodu niedokrwistości (Hb 7,3 G/l) i limfopenii $0,7x10^3/\mu l$) z wysypką rumieniowo-grudkową, której nie obserwowano w okresie noworodkowym. Wykluczono niedobór witaminy B12 i kwasu foliowego. Cytometria przepływowa wykazała głęboką limfopenię z liczbą limfocytów T 30 komórek/µl, limfocytów B CD19+ 93 komórki/µl i komórek NK CD3-CD56+CD16+ 196 komórek/µl. W biopsji szpiku kostnego stwierdzono szpik kostny bogatokomórkowy ze zredukowaną linią erytroblastyczną i limfoidalną, bez cech rozrostu nowotworowego [Rycina 10A]. Na podstawie uzyskanych wyników badań laboratoryjnych wysunięto podejrzenie ciężkiego złożonego niedoboru odporności. Niemowlę przyjęto do Kliniki Immunologii IPCZD w Warszawie, w wieku 8 tygodni, w stanie ogólnym średnim. U pacjenta stwierdzono uogólnione rumieniowo-złuszczające zlokalizowane głównie na twarzy [Rycina 2B], zapalenie spojówek o etiologii gronkowca złocistego i powiększone węzły chłonne szyjne i pachwinowe o średnicy do 1 cm. Wielkość śledziony i wątroby mieściła się w granicach normy wiekowej. Długość ciała

oceniana na siatkach centylowych dla wcześniaków w wieku ciążowym 32-37 tygodni była poniżej 3 percentyla, ale masa ciała i obwód głowy były proporcjonalne do długości. W leczeniu stosowano ogólnoustrojową antybiotykoterapię, palivizumab i dożylne immunoglobuliny, kontynuowano profilaktykę przeciwwirusową, przeciwgrzybiczą, przeciwpneumocystodozową. Z powodu niedokrwistości dziewczynka wymagała transfuzji uzupełniających krwinek czerwonych co około 2 tygodnie. Podczas hospitalizacji obserwowano łagodną, przewlekłą biegunkę i nadżerki wokół odbytu z przejściowym dodatnim wynikiem badania kału na obecność rotawirusa. Powtórzono badania immunologiczne i na podstawie wyników rozpoznano ciężki złożony niedobór odporności ze zmniejszoną liczbą komórek T, B i NK [Tabela 8]. Z powodu rumieniowo-złuszczających zmian skórnych, obwodowej limfadenopatii, eozynofilii (7020/µl), oligoklonalnego rozkładu łańcucha Vb TCR [Rycina 11A], pomimo niskiego stężenia IgE (<2,00 kIU/l) wysunięto podejrzenie zespołu Omenna Wykluczono chimeryzm matczyno-płodowy. Fibroblasty wyhodowane z biopsji skóry wykazały częściową wrażliwość na promieniowanie jonizujące [Rycina 11B] w porównaniu z fibroblastami pochodzącymi od pacjenta z radiowrażliwym SCID z powodu niedoboru Artemis. Nie przeprowadzono oceny histopatologicznej biopsji skóry z powodu małej powierzchni typowych zmian skórnych, występujących głównie na głowie i twarzy. Zastosowano skojarzone leczenie immunosupresyjne prednizonem i cyklosporyną A uzyskując stopniową poprawę stanu skóry i zmniejszenie eozynofilii. Przeprowadzono diagnostykę genetyczną za pomocą sekwencjonowania całego eksomu DNA pacjenta przy użyciu zestawu Twist Human Core Exome Plus Kit (Twist Bioscience). Wyniki badań genetycznych wykazały obecność dwóch wariantów w układzie heterozygotycznym w genie *LIG1* (NM_000234.1): wariantu missense o niepewnym znaczeniu klinicznym (c.2312 G>A, p.Arg771Gly), ale o wysokich wynikach patogenności (w tym wyniku DANN (7) sięgającym 0,9995) oraz prawdopodobnie patogennego wariantu splicingowego c.776+5G>T, p.Pro260*. Aby sprawdzić, czy wariant c.776+5G>T wpływa na splicing mRNA, przeprowadzono bezpośrednie sekwencjonowanie cDNA. Stwierdzono, że wariant splicingowy spowodował wstawienie 16 nukleotydów w intronie 9, co doprowadziło do przedwczesnej terminacji syntezy białka w pozycji 260 (Rycina 11C). Następnie przeprowadzono bezpośrednie sekwencjonowanie DNA dziecka i jego rodziców w celu wykrycia obecności obu wariantów *LIG1*. Stwierdzono, że każde z rodziców jest nosicielem pojedynczego wariantu w genie *LIG1*, co potwierdziło, że oba warianty *LIG1* znajdują się u probanta na oddzielnych allelach. Zbiory danych przesyłano do repozytorium Europejskiego Archiwum Zmienności (The European Variation Archive - EVA)

(https://www.ebi.ac.uk/eva/?eva-study=PRJEB*****) i są publicznie dostępne pod numerem projektu PRJEB56316, numerami przyjęcia ERZ14199911 w EMBL-EBI. Ze względu na cechy immunologiczne ciężkiego złożonego niedoboru odporności, dziewczynka została zakwalifikowana do przeszczepienia macierzystych komórek krwiotwórczych od dawcy niespokrewnionego. W wieku 4 miesięcy przeprowadzono MUD HSCT, stosując protokół GEFA03, z dożylnym busulfanem, fludarabiną, cyklofosfamidem i i.v. globuliną antytymocytarną (ATG). Profilaktyka choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) składała się z cyklosporyny A i metotreksatu. Przeszczepiono komórki progenitorowe krwi obwodowej w dawce 14,67 x 10^6 komórek CD34+/kg masy ciała. Pacjentka osiągnęła mieszany chimeryzm hematopoetyczny, który ustabilizował się na poziomie 60-70% komórek jednojądrowych pochodzenia dawcy i ponad 90% limfocytów pochodzenia dawcy. W momencie przygotowywania manuskryptu dziewczynka była obserwowana przez dwa lata po HSCT. Jej rozwój fizyczny i motoryczny był lekko opóźniony. Limfopenia B była obserwowana stale, a pacjentka wymagała terapii immunoglobulinami, a także sporadycznie - transfuzji uzupełniających krwinek czerwonych. Bezpośrednie i pośrednie testy antyglobulinowe były ujemne, aktywność dehydrogenazy mleczanowej, wyniki bilirubiny bezpośredniej i pośredniej mieściły się w zakresie normy. Z powodu niedokrwistości rozważano drugie HSCT.

Dyskusja

Opisana pacjentka wykazywała unikatowe objawy kliniczne związane z wariantami w obrębie genu *LIG1* w układzie heterozygotycznym. Wariant splicingowy c.776+5G>T, p.Pro260* spowodował insercję 16 nukleotydów w intronie 9 *LIG1*, co prowadziło do przedwczesnego zakończenia białka w pozycji 260, a w konsekwencji - do braku funkcjonalnych domen białka. Wariant typu missense (c. 2311G> T, p.Arg771Gly, R771G), który wpłynął na strukturę domeny wiążącej katalityczne oligonukleotydy/oligosacharydy, był zlokalizowany w tej samej pozycji, co u 4 innych pacjentów z niedoborem LIG1 (R771W), ale związany z inną zmianą aminokwasów [83-84]. Warianty R771W, jak i R641L zmniejszają aktywność ligazy DNA [85-86]. Biologiczna funkcja ligazy DNA 1 w replikacji i naprawie DNA jest związana z łączeniem fragmentów Okazaki podczas replikacji i katalizowaniem ostatecznego etapu ligacji DNA [86]. Funkcje komórkowe LIG1 są przekazywane przez jego domenę N-końcową (aminokwasy 1-261), która zawiera sygnał lokalizacji jądrowej i uczestniczy w interakcjach białko-białko [87]. Niedobór ligazy DNA I jest niezwykle rzadką przyczyną IEI z różnym spektrum objawów klinicznych wpływających nie tylko na odporność, ale także

na wzrost, rozwój psychomotoryczny i produkcję komórek krwi. Przebieg choroby opisanego pacjenta obejmował ciężką niedokrwistość wymagającą wielokrotnych transfuzji krwinek czerwonych od pierwszych godzin życia. Nie jest jasne, dlaczego warianty patogenne w genie *LIG1* powodują niedokrwistość makrocytarną i inne objawy pozaszpikowe, ani czy istnieje jakakolwiek korelacja genotyp-fenotyp. Niedokrwistość makrocytarna prawdopodobnie wynika z upośledzonej syntezy DNA w komórkach prekursorowych układu krwiotwórczego, jednak w przeciwieństwie do niedokrwistości Fanconiego - nie prowadzi do niewydolności szpiku kostnego, ale do hemolizy umiarkowanie kompensowanej przez produkcję retikulocytów. Zaburzona synteza DNA może również wpływać na inne szybko dzielące się komórki krwiotwórcze. Podejrzenie IEI wysunięto w wieku 8 tygodni, gdy podczas badań w kierunku przyczyny niedokrwistości hemolitycznej zauważono brak limfocytów T i niską liczbę limfocytów B. Rozpoznanie SCID T-B-NK+ było podobne do diagnozy u dwóch innych opisywanych chłopców [88]. Obecność rumieniowo-złuszczających zmian skórnych sugerujących zespół Omenna, spowodowanych niekontrolowaną proliferacją autologicznych limfocytów T, była unikatową cechą u naszej pacjentki. Diagnozę potwierdzono kryteriami klinicznymi, które stwierdzają, że prawdopodobne rozpoznanie zespołu Omenna może zostać postawione, gdy złuszczająca erytrodermia wystąpi w pierwszym roku życia i towarzyszy jej co najmniej jeden objaw kliniczny: limfoproliferacja, brak przyrostu masy ciała, przewlekła biegunka, nawracające zapalenie płuc, eozynofilia lub podwyższone IgE z niedoborem limfocytów T (niska liczba komórek naiwnych, zmniejszona proliferacja, oligoklonalność) oraz po wykluczeniu chimeryzmu matczyno-płodowego i zakażenia HIV [89]. Nasza pacjentka była skutecznie leczona jako zespół Omenna prednizonem i cyklosporyną: ustąpiły zmiany skórne, limfadenopatia i biegunka, a liczba eozynofilów uległa normalizacji.

Podstawową konsekwencją niedoboru LIG1 jest upośledzony mechanizm naprawy DNA. Komórki naszej pacjentki wykazywały zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące, promieniowanie UV i czynniki uszkadzające DNA in vitro, jak u pierwszego opisanego pacjenta [88]. Na podstawie wytycznych dotyczących HSCT u pacjentów z radiowrażliwością i doświadczenia ośrodka przeszczepiającego - zastosowano protokół kondycjonowania o zmniejszonej intensywności. Okres okołoprzeszczepowy przebiegał bez istotnych powikłań. Jednak zmodyfikowany niemiecki protokół leczenia niedokrwistości Fanconiego nie wykazał wystarczającego potencjału mieloablacyjnego, jak zaobserwowano w przypadku pacjentów z zespołem ataksji-teleangiektazji i zespołem Nijmegen [90-91]. Nie można wykluczyć, że suboptymalna mielosupresja spowodowała autologiczną odnowę komórek NK i przyspieszoną eliminację hematopoezy pochodzącej od dawcy. Nie oceniano

chimeryzmu komórek B i NK. Ocenę chimeryzmu mieloidalnego w komórkach CD15-dodatnich przeprowadzono tylko raz. Wszystkie inne pomiary chimeryzmu przeprowadzono w komórkach jednojądrzastych lub limfocytach T. Można postawić hipotezę, że szczątkowa hematopoeza i mielopoeza dawcy (ok. 2% wszystkich komórek CD15) była odpowiedzialna za produkcję komórek NK i brak konkurencji ze strony autologicznych komórek limfoidalnych. Opisana procedura HSCT w niedoborze LIG1 sugeruje skuteczność minimalnego kondycjonowania o dużej intensywności, ale nie potwierdziło się to w przypadku naszego pacjenta. Obaj wcześniej opisywani chłopcy, którzy byli poddani procedurze HSCT w Great Ormond Street Hospital w Londynie od dawców rodzinnych, otrzymali kondycjonowanie o minimalnej intensywności: fludarabina 150 mg/m2, cyklofosfamid 1000 mg/m2, alemtuzumab 1 mg/kg i YTH 24/54 (przeciwciała monoklonalne anty-CD45) 800 mg/kg. Chociaż pierwszy pacjent otrzymał dodatkowo YTH 24/54 przeciwciała monoklonalne anty-CD45 w zmniejszonej dawce z powodu reakcji niepożądanej podczas infuzji, osiągnął pełny chimeryzm wieloliniowy dawcy. Drugi pacjent wykazał niski poziom przeszczepienia komórek B, wymagał transfuzji koncentratu krwinek czerwonych i pozostawał na terapii zastępczej immunoglobulinami [88]. Optymalny protokół kondycjonowania z wystarczającym przeszczepieniem mieloidalnym jest ważny w przypadku rozważanej retransplantacji, ale nie ma wystarczających danych, aby określić odpowiednie schematy chemioterapii.

IX.6. Opis przypadku i dyskusja publikacji numer 6

W publikacji pt. „Atypical Hemolytic Uremic Syndrome (aHUS) and Adenosine Deaminase (ADA)-Deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-Two Diseases That Exacerbate Each Other: Case Report" opisano przypadek chłopca z ciąży drugiej, porodu drugiego, urodzonego w 38. tygodniu ciąży, siłami natury, z masą urodzeniową 3150 g, długością ciała 54 cm, ocenionego na 9 punktów w skali Apgar. Od pierwszych miesięcy życia u pacjenta występowały nawracające biegunki, obserwowano zahamowanie przyrostu masy ciała i opóźnienie rozwoju psychoruchowego. W wieku trzech miesięcy chłopiec przebył ospę wietrzną, a sześć miesięcy później półpasiec [Rycina 12]. Wówczas pacjent był hospitalizowany z powodu ostrej niewydolności nerek z bezmoczem, obrzękiem uogólnionym i niewydolnością oddechową wymagającej leczenia na oddziale intensywnej terapii. W wynikach badań stwierdzono szereg nieprawidłowości: podwyższona liczba retikulocytów, hiperbilirubinemia, podwyższone stężenie kreatyniny w surowicy i podwyższona aktywność dehydrogenazy mleczanowej, a także białkomocz i krwiomocz, które budziły podejrzenie zespołu hemolityczno-mocznicowego. Ponadto w rozmazie krwi obwodowej stwierdzono obecność schistocytów, stanowiących 6% erytrocytów oraz podwyższone wartości aminotransferazy asparaginianowej (AST), aminotransferazy alaninowej (ALT), gamma-glutamylotransferazy (GGT) i białka C-reaktywnego (CRP). Chłopiec został zakwalifikowany do ciągłej dializy otrzewnowej. Ponadto, ze względu na podejrzenie aHUS i koagulopatię (trombocytopenia, wydłużony czas kaolinowo-kefalinowy i czas protrombinowy wraz ze zmniejszoną aktywnością fibrynogenu), przetaczano czynniki krwiopochodne. Wykluczono zakażenie *Escherichia coli* wytwarzające toksynę Shiga na podstawie posiewu kału. Ocena składników dopełniacza wykazała nieznacznie obniżone stężenie składowej C3, a C4 w zakresie normy. Aktywność ADAMTS13 (A Disintegrin-like And Metalloprotease with Thrombospondin motifs 13) wynosiła 60%. Dializę otrzewnową prowadzono przez 29 dni, a transfuzje osocza krwi i leczenie farmakologiczne nie przyniosły znaczącej poprawy stanu pacjenta. W związku z tym zdecydowano się na przeprowadzenie ośmiu cykli plazmaferezy, z dobrą odpowiedzią kliniczną (w tym czasie leczenie ekulizumabem było niedostępne). Ilość wymienionego osocza wynosiła średnio 600 ml/sesję (80 ml/kg/masy ciała). Dodatkowo chłopiec otrzymywał skojarzoną terapię hipotensyjną, obejmującą amlodypinę, bisoprolol i ramipril. Przez następne miesiące pacjent pozostawał pod ambulatoryjną opieką nefrologiczną. W wieku 13 miesięcy chłopiec został przyjęty do szpitala z powodu wysokiej temperatury ciała i ciężkiego odwodnienia, któremu towarzyszyły podwyższone stężenia

AST, GGT i CRP. Dalsze badanie wykazało infekcję górnych dróg moczowych (zapalenie gardła i migdałków), po której nastąpił obrzęk uogólniony, oliguria i hipoalbuminemia. W związku z tym podano amoksycylinę z kwasem klawulanowym, furosemid i 20% roztwór albuminy. Niestety, leczenie nie przyniosło rezultatu, wystąpiły lewostronne napady częściowe i odgięciowe ułożenie. Wykonano tomografię komputerową głowy (TK) i analizę płynu mózgowo-rdzeniowego, ale nie stwierdzono żadnych nieprawidłowości. W echokardiogramie stwierdzono ubytek przegrody międzyprzedsionkowej i niewielką niedomykalność zastawki trójdzielnej. W kolejnych dniach pojawiły się objawy obrzęku płuc i chłopiec wymagał dializy otrzewnowej i wentylacji mechanicznej przez 6 dni. Dalsze badania wykazały stężenie kreatyniny w surowicy wynoszące 37,7 µmol/l i stężenie mocznika wynoszące 8,7 mmol/l. Po kilku dniach stabilnego stanu rozwinęło się zapalenie płuc z towarzyszącą ciężką niedokrwistością. Podczas transfuzji krwi doszło do nagłego zatrzymania czynności serca i chłopiec ponownie wymagał intensywnej opieki. Gdy stan się poprawił, wykonano biopsję nerki, która ujawniła proliferację komórek mezangialnych, złogi hialinowe w świetle kłębuszków nerkowych i pogrubienie w obrębie każdej warstwy ściany tętnicy. Taki opis przemawiał za błoniasto-rozplemowym kłębuszkowym zapaleniem nerek z waskulopatią [Ryciny 13 i 14]**.** Badanie szpiku kostnego, wykazało limfopenię (23%). Po kilku dniach od biopsji nerki zauważono krwiomocz, a USG jamy brzusznej ujawniło przetokę tętniczo-żylną prawej nerki; w związku z tym u chłopca wykonano embolizację uszkodzonej tętnicy. W związku z podejrzeniem aHUS przeprowadzono badania genetyczne, przeanalizowano geny *ADAMTS13, C3, C5, CD46, CFB, CFH, CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4, CFHR5, CFI, DGKE, MMACHC, PLG, THBD*. Analiza dużych delecji i rearanżacji nie wykazała wariantów patogennych w genie *CFHR1-5*, a także w genach *DGKE, MMACHC, PLG, THBD, C3, C5* i *CFI*. W genie *CFH* wykryto wariant wysokiego ryzyka rozwoju aHUS i związany ze złym rokowaniem i większym ryzykiem odrzucenia przeszczepu [92]. Dodatkowo w genie *CD46* wykryto trzy haplotypy wysokiego ryzyka (rs2796267, rs2796268 i rs859705) [93-94]. Obie kopie genu *ADAMTS13* zostały opisane z wariantem rs2301612, wcześniej wykrytym u pacjentów z tętniakami [95]. Co więcej, inny wariant, dość rzadki w populacji ogólnej, o nieznanej patogenności został wykryty w pojedynczej kopii genu *CFB* (rs13194698; NM_001710.5:c.299-111C>T). U pacjenta stwierdzono utrzymującą się limfopenię, a bezwzględna liczba limfocytów w zakresie od 0,17 do 0,8 × 10^3/µl. Badanie subpopulacji limfocytów wykazało zmniejszoną liczbę limfocytów B, T i komórek NK, co sugerowało rozpoznanie SCID T-B-NK- i skłoniło do dalszej diagnostyki immunologicznej. Komórki CD45+ wykazywały antygen powierzchniowy RO w 95,5% komórek. Stężenia

wszystkich głównych klas immunoglobulin były istotnie poniżej normy. Wykonane badania genetyczne ujawniły wariant patogenny w genie ADA w układzie homozygotycznym (c.302G>A). Rozpoznano ADA-SCID. Niestety, progresja zakażeń i choroby podstawowej doprowadziła do niewydolności wielonarządowej i zgonu pacjenta w wieku 16 miesięcy.

Dyskusja

W przedstawionym przypadku wstępną diagnozą była mikroangiopatyczna niedokrwistość hemolityczna. Wyróżnia się trzy główne typy tej niedokrwistości: pierwotne (wrodzone i nabyte), i wtórne wywołane zakażeniem. Aby wykluczyć zakrzepową plamicę małopłytkową (TTP), wykonano badanie aktywności ADAMTS13, uzyskując wynik powyżej 10%. HUS wywołany przez bakterie wytwarzające toksynę Shiga, głównie Escherichia coli, jest najczęstszym typem wśród najmłodszych pacjentów [96-97]. Tak więc, głównym krokiem w diagnostyce różnicowej aHUS u dzieci jest wykluczenie zakażenia. Dlatego w opisanym przypadku wykonano badanie posiewu kału, wykluczając zakażenie wywołane przez szczepy bakterii wytwarzające werotoksynę. Ponadto połączenie niskiego stężenia składowej C3 dopełniacza i prawidłowego stężenia składowej C4 dopełniacza wskazywało na rozpoznanie aHUS. Biopsja nerki wykazała błoniastorozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek z obecnością zakrzepowej mikroangiopatii i złogów włóknika potwierdzając patologię związaną z aHUS. Chociaż w tej dziedzinie nastąpił znaczny postęp, u około 40% pacjentów etiologia aHUS jest nadal nieznana [98]. Rozpoznanie aHUS jest nadal trudne do jednoznacznego ustalenia, ponieważ nie istnieje bezpośredni test diagnostyczny, a dostępne biomarkery nie są całkowicie wiarygodne [96-97]. Diagnostyka genetyczna jest obowiązkowym elementem procesu diagnostycznego. Wśród zaburzeń genetycznych związanych z aHUS u przedstawionego pacjenta stwierdzono warianty patogenne w genach *CFB, CFH* i *MCP*. Haplotyp czynnika dopełniacza H TGTGT jest umiarkowanym czynnikiem ryzyka według de Cordoby i in. [92]. Wykryte warianty w genie *MCP* u naszego pacjenta zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami Fremeaux-Bacchi pokazują, że zmienność genetyczna w *MCP* jest również związana z atypowym HUS w tym przypadku [93]. W diagnostyce różnicowej wykluczono warianty patogenne w genie kinazy diacyloglicerolowej epsilon (*DGKE*), których obecność może być odpowiedzialna za patologię nerek w postaci mikroangiopatii zakrzepowej [99-100] i choroby kobalaminy C, która może również objawiać się jako HUS w okresie niemowlęcym [101]. Dodatkowo, kopie genu *ADAMTS13* zostały opisane z wariantem zdefiniowanym wcześniej u pacjentów z tętniakami, który jest wariantem łagodnym, nieobniżającym aktywności ADAMTS13 [95,

102]. W obrazowaniu TK tętniaki zostały wykluczone u prezentowanego pacjenta. Taki wariant genu *ADAMTS13* jest często obserwowany u pacjentów z aHUS. Wykonanie badań genetycznych nie powinno opóźniać leczenia aHUS. Dlatego też zastosowano odpowiednią terapię zgodną ze standardami opieki przy pierwszym wystąpieniem aHUS, w tym terapię wymiany osocza, ponieważ leczenie ekulizumabem nie było jeszcze wówczas dostępne w Polsce [103]. W opisanym przypadku incydent oligurii powodujący ciężkie przewodnienie został zdefiniowany jako zaostrzenie przewlekłej choroby nerek podczas zakażenia septycznego. Występujące powikłania neurologiczne z prawidłowym początkowo wynikiem tomografii komputerowej głowy i płucne nie były wiązane z aHUS.

W przedstawionym przypadku badania genetyczne wykazały wariant patogenny w genie *ADA* w układzie homozygotycznym i doprowadziły do rozpoznania zaburzeń metabolizmu puryn. Niedobór ADA jest związany z zaburzeniem metabolizmu puryn, które wpływa na różne komórki [104]. ADA jest głównym enzymem w deaminacji nukleozydów purynowych, takich jak adenozyna (Ado) do inozyny i 20-deoksyadenozyny (d-Ado) do 20-deoksyinozyny (d-Ino) [105-106]. W przypadku braku tej reakcji w metabolizmie puryn, d-Ado i Ado gromadzą się w płynach i składnikach komórkowych osób dotkniętych chorobą, powodując uszkodzenie komórek odpornościowych, głównie wpływając na rozwój i funkcję komórek T, B i NK, a także na narządy pozaszpikowe [107-108]. Pacjent od początku prezentował głęboką limfopenię i wykazywał podwyższony odsetek limfocytów pamięci CD45RO+. Warto wspomnieć, że plazmafereza i wielokrotne transfuzje osocza, stosowane w leczeniu aHUS, mogły zapewnić pacjentowi bierną odporność humoralną. Według literatury mechanizm ADA-SCID wpływający na rozwój aHUS może być związany z infekcją, deregulacją funkcji dopełniacza, autoimmunizacją lub upośledzonym metabolizmem; jednak nie ustalono pewnych powiązań [109-110]. Zwężenie tętniczek nerkowych doprowadzających i późniejsze zmniejszenie filtracji kłębuszkowej są konsekwencjami sygnalizacji przez receptor adenozyny A1 [111-112]. Dlatego podejrzewa się, że podwyższony poziom adenozyny pozakomórkowej w tkance nerkowej u pacjentów z niedoborem ADA stopniowo wywołuje białkomocz nerczycowy, ponieważ raporty z sekcji zwłok pacjentów z ADA-SCID ujawniły stwardnienie mezangialne w większości przypadków i uogólnione stwardnienie kłębuszków nerkowych w nawet 10% kłębuszków nerkowych w momencie zgonu [113]. Takie ustalenia mogą mieć wpływ na przebieg aHUS, przyspieszając postęp niewydolności nerek i zmniejszając odpowiedź na leczenie. Wyniki tego przypadku, wraz z przypadkami opisanymi w cytowanych odniesieniach [109-110], sugerują, że ADA-SCID oprócz aHUS może objawiać się nefropatią w okresie niemowlęcym, również z powodu uszkodzenia tętnic

i kłębuszków nerkowych wywołanego przez adenozynę z równoczesnymi uszkodzeniami wątroby. Uważa się, że kombinacja czynników sprzyjających rozwojowi aHUS obejmuje zakażenia, zaburzenia genetyczne i podatność środowiskową [114-115]. Stąd też zakażenie wirusem półpaśca, przedstawione w tym przypadku, uznano za czynnik wyzwalający rozwój aHUS. Rozsiana ospa wietrzna wywołana wirusem dzikiego typu lub po szczepieniu przeciw ospie wietrznej u pacjentów z SCID, w tym ADA-SCID, została już opisana [116]. Uważa się, że pacjenci z ADA-SCID są bardziej narażeni na rozwój aHUS w wyniku choroby wywołanej przez szeroki zakres patogenów lub nawet oportunistyczną infekcję. Jak wspomniano powyżej, zaburzenia metabolizmu puryn spowodowane niedoborem ADA mogą wpływać na różne tkanki poprzez obecnie nieznane mechanizmy. Zakłada się, że biologicznie czynne metabolity puryn gromadzące się w organizmie mogą wywoływać zmiany metaboliczne, które w konsekwencji mogą przyczyniać się do predyspozycji do rozwoju aHUS, o czym wspomniano także w badaniu Nikolajeva i in. [109].

X. Podsumowanie wyników i wnioski

Tematem pracy doktorskiej jest przebieg kliniczny różnych postaci ciężkiego złożonego niedoboru odporności zdiagnozowanych w Klinice Immunologii IP CZD i zagadnienia te zostały przedstawione we wszystkich pracach. Wykazano, że:

1. Pierwsze objawy i rozpoznanie stawiano wcześniej u dzieci z TS i OS niż AS.
2. Objawami nasuwającymi podejrzenie SCID i skierowania do diagnostyki immunologicznej u większości pacjentów były zakażenia – ciężkie, zagrażające życiu, nawracające, oportunistyczne lub rozsiane zakażenie prątkiem BCG.
3. Limfopenia była stwierdzana w chwili diagnozy u większość pacjentów (80%) i powinna być już wcześniej przyczyną poszerzenia diagnostyki w kierunku SCID.
4. Wczesna diagnoza u pacjentów ADA-SCID może wynikać z obecności leukopenii (z neutropenią i limfopenią) co zwracało uwagę pediatrów i pozwalało wysunąć podejrzenie niedoboru odporności. Izolowana limfopenia bez leukopenii i neutropenii u pacjentów z innymi postaciami SCID bywa przeoczana.
5. Najdłuższe opóźnienie rozpoznania, pomimo współistniejącej limfopenii, mieli pacjenci z atypową postacią SCID, pozostający pod opieką hematologiczną (mediana opóźnienia rozpoznania 19 miesięcy). Diagnostykę w kierunku SCID zaleca się u niemowląt z limfopenią, zwłaszcza z aplazją/hipoplazją grasicy lub zmianami dysplastycznymi kości mogącymi wskazywać na ADA-SCID (ostry kąt łopatki).
6. Zakażenie prątkiem szczepionkowym BCG (miejscowe lub rozsiane) było najczęstszym zakażeniem. Rozsiane zakażenie dotyczyło niespełna 20% pacjentów ze SCID szczepionych w Polsce i wszyscy ci pacjenci mieli niską liczbę komórek NK. Podszczep Moreau BCG produkowany w Polsce przez firmę Biomed a pochodzący od podszczepu *Mycobacterium bovis BCG Moreau Rio de Janeiro* jest bezpieczniejszy niż w populacji brazylijskiej (48% pacjentów SCID szczepionych BCG miało zakażenie rozsiane) lub w innych populacjach światowych (34% pacjentów SCID miało BCG-itis).
7. Diagnostyka genetyczna wykazała, że najczęstszymi genotypami SCID pacjentów diagnozowanych w Oddział Immunologii IPCZD w latach 2010-2023 były *IL2RG, RAG1/2, JAK3* i *ADA*, nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania genotypów pomiędzy TS, AS i OS.
8. W genie *RAG1* u naszych pacjentów dominuje wariant c.256_257delAA w układzie homozygotycznym. Wysoki odsetek tego wariantu wśród dzieci pochodzących

z Polski środkowo-wschodniej oraz obecność u wszystkich Słowian, może wskazywać, że jest to wariant założycielski, który pochodzi z dorzecza Wisły w Polsce.

9. Leczeniem przyczynowym pacjentów ze SCID jest HSCT. Część pacjentów z ciężkimi zakażeniami lub niewydolnością wielonarządową umiera przed postawieniem rozpoznania lub w okresie okołoprzeszczepowym. Przeżycie pacjentów ze SCID diagnozowanych w Oddziale Immunologii IPCZD w latach 2010-2023 było wyższe u chorych diagnozowanych i leczonych we wczesnym okresie niemowlęcym z obciążonym wywiadem rodzinnym, w porównaniu z pacjentami, u których diagnoza była stawiana po pojawieniu się objawów (80% vs 67%).
10. ETZ była efektywna u wszystkich czterech leczonych pacjentów z ADA-SCID. Żaden z nich nie był poddany terapii genowej, na co wpłynął ograniczony dostęp do procedury.
11. SCID jest chorobą ultrarzadką. Niektórzy pacjenci prezentują nietypowe objawy kliniczne. Przedstawiono dziecko ze SCID o typie zespołu Omenna, z towarzyszącą ciężką wrodzoną niedokrwistością makrocytarną i deficytem ligazy DNA I. U naszej pacjentki wczesna diagnoza wynikała z obecności ciężkiej niedokrwistości makrocytarnej oraz towarzyszącej limfopenii. W naszej pracy po raz pierwszy zespół Omenna opisano u złożonej heterozygoty, z dwoma nowymi wariantami w genie *LIG1*: p.Arg771Gly i p.Pro260*. Nietypowy przebieg SCID z dominacją objawów nefrologicznych takich jak aHUS, niewydolność nerek prowadzących do niewydolności wielonarządowej może wynikać defektu deaminazy adenozyny.

Przedstawiona w pracach charakterystyka objawów klinicznych i wyników badań może pozwolić na poprawę diagnostyki SCID, przed rozwinięciem powikłań, a przez to zwiększyć przeżywalność pacjentów.

W leczeniu ADA SCID duże znaczenie ma ETZ. Publikacja opisuje doświadczenia na jednej z większych grup pacjentów i wskazuje na dużą skuteczność leczenia przed wdrożeniem leczenia docelowego (HSCT, TG).

Szczegółową dyskusję parametrów klinicznych i laboratoryjnych przedstawiono w pracach wchodzących w skład rozprawy.

XI. Wykaz tabel i rycin

Tabela 1. Przebieg czasowy diagnostyki i wyniki badań laboratoryjnych w typowym SCID (TS), atypowym SCID (AS) i zespole Omenna (OS), IgG – immunoglobuliny klasy G, IgM – immunoglobuliny klasy M, RTE (recent thymic emigrants) – emigranci z grasicy, PHA – (phytohemagglutinin) - fitohemaglutynina, SI (stimulation index) – indeks stymulacji, (wartości referencyjne SI dla PHA ≥65 i dla anti-CD3 ≥60)

	SCID Mediana (kwartyle: Q1; Q3)	TS	AS	OS	p-value
Wiek pierwszych objawów (miesiące)	2.0 (0.93; 6)	2.0 (1.2; 4.7)	4.9 (1.7; 8)	0.9 (0.3;1)	p =0.0181
Wiek diagnozy (miesiące)	4.4 (2.5; 8.8)	3.0 (0.5; 7.5)	8 (4; 20.2)	2.3 (1.8; 2.8)	p =0.0011
Opóźnienie diagnozy (miesiące)	2.5 (1.2; 7.1)	2.4 (1.3; 3.4)	4.7 (1.1; 19)	1.7 (1.6; 1.,8)	p =0.2798
IgM [g/l]	0.23 (0.09; 0.74)	0.19 (0.07; 0.26)	0.61 (0.22; 1.85)	0.14 (0.05; 0.51)	p =0.0160
PHA [SI]	3.3 (1.1; 11.1)	1 (1; 1.7)	11.1 (5.6; 20.7)	8.8 (5; 12.5)	p =0.0001
Anti-CD3 [SI]	6.9 (1.3; 16.1)	1.1 (1; 1.4)	15.3 (9.3; 37.5)	11.05 (4.95; 15.2)	p =0.0005
RTE (%)	0.95 (0.2; 3.5)	0.2 (0; 1.3)	2.1 (0.6; 5.9)	0.3 (0.1; 0.5)	p =0.1387

Tabela 2. Dane kliniczne i wyniki badań laboratoryjnych w typowym SCID (TS), atypowym SCID (AS) i zespole Omenna (OS).

	SCID (liczba pacjentów)	TS	AS	OS	p-value (Chi^2 Pearsona)
Płeć					
- żeńska	16/42 (38.1 %)	5 (29.4 %)	7 (36.8 %)	4 (66.7 %)	0.2681
- męska	26/42 (61.9 %)	12 (70.6 %)	12 (63.2 %)	2 (33.3 %)	
Lekarz kierujący					
- pediatra	16/36 (44.4 %)	9/12 (75 %)	6/19 (31.6 %)	1/5 (20 %)	
- hematolog	7/36 (19.4 %)	1/12 (8.3 %)	5/19 (26.3 %)	1/5 (20%)	
- dermatolog	3/36 (8.3 %)	0/12 (0%)	0/19 (0%)	3/5 (60%)	
- anestezjolog	4/36 (11.1 %)	1/12 (8.3 %)	3/19 (15.8 %)	0/5 (0%)	
- spec. chorób zakaźnych	1/36 (2.8 %)	1/12 (8.3 %)	0/19 (0 %)	0/5 (0 %)	0.0126
- nefrolog	1/36 (2.8 %)	0/12 (0 %)	1/19 (5.3 %)	0/5 (0 %)	
- gastroenterolog	2/36 (5.6 %)	0/12 (0 %)	2/19 (10.5 %)	0/5 (0 %)	
- pulmonolog	1/36 (2.8 %)	0/12 (0 %)	1/19 (5.3 %)	0/5 (0 %)	
- kardiolog	1/36 (2.8 %)	0/12 (0 %)	1/19 (5.3 %)	0/5 (0 %)	
Pierwsze objawy					
- zapalenie płuc	11/36 (30.6 %)	4/12 (33.3 %)	7/19 (36.8 %)	0/5 (0%)	
- afty w Jamie ustnej	2/36 (5.6 %)	2/12 (16.7 %)	0/19 (0 %)	0/5 (0 %)	
- zapalenie mózgu	2/36 (5.6 %)	1/12 (8.3 %)	1/19 (5.3 %)	0/5 (0 %)	
- nawracające zakażenia dróg oddechowych	6/36 (16.7%)	2/12 (16.7 %)	4/19 (21 %)	0/5 (0 %)	
- zakażenie BCG	1/36 (2.8 %)	1/12 (8.3 %)	0/19 (0 %)	0/5 (0 %)	0.1908
- przewlekła biegunka	2/36 (5.6 %)	1/12 (8.3 %)	1/19 (5.3 %)	0/5 (0 %)	
- zakażenie uogólnione	1/36 (2.8 %)	0/12 (0 %)	1/19 (5.3 %)	0/5 (0 %)	
- wysypki	8/36 (22.2 %)	1/12 (8.3 %)	3/19 (15.8 %)	4/5 (80 %)	
- niedokrwistość	2/36 (5.6%)	0/12 (0%)	1/19 (5.3%)	1/5 (20%)	
- limfopenia	1/36 (2.8 %)	0/12 (0 %)	1/19 (5.3 %)	0/5 (0 %)	
Infecje					
- CMV	6/40 (15 %)	2/17 (11.8 %)	3/17 (17.6 %)	1/6 (16.7 %)	0.8842
- BCG	18/32 (56.3 %)	10/12 (83.3 %)	7/16 (43.8 %)	1/4 (25 %)	0.1408
- PJP	7/41 (17.1 %)	3/17 (17.6 %)	3/18 (16.7 %)	1/6 (16.7 %)	0.9966

- grzybicze	13/34 (38.2 %)	8/13 (61.5 %)	5/15 (33.3 %)	0/5 (0 %)	0.0325
- bakteryjne	20/39 (51.3 %)	5/17 (29.4 %)	10/16 (62.5 %)	5/6 (83.3 %)	0.0382
Limfopenia	31/39 (79.5 %)	15/17 (88.2%)	14/16 (87.5 %)	2/6 (33.3 %)	0.0097
Neutropenia	14/39 (35.9 %)	6/17 (35.3 %)	7/16 (43.8 %)	1/6 (16.7 %)	0.4977
Eosynofilia	12/39 (30.8 %)	1/17 (5.9 %)	5/16 (31.3 %)	6/6 (100 %)	0.0001
IgM					
- niskie	18/40 (45 %)	9/16 (56.3 %)	5/18 (27.8 %)	4/6 (66.7 %)	
- prawidłowe	13/40 (32.5 %)	6/16 (37.5 %)	6/18 (33.3 %)	1/6 (16.7 %)	0.1375
- wysokie	9/40 (22.5 %)	1/16 (6.3 %)	7/18 (38.9 %)	1/6 (16.7 %)	
IgG					
- niskie	17/41 (41.5 %)	8/17 (47.1 %)	7/18 (38.9 %)	2/6 (33.3 %)	
- prawidłowe	19/41 (46.3 %)	7/17 (41.2 %)	9/18 (50 %)	3/6 (50 %)	0.9697
- wysokie	5/41 (12.2 %)	2/17 (11.8 %)	2/18 (11.1 %)	1/6 (16.7 %)	
Niskie IgG+IgM	7/41 (17.1 %)	4/17 (23.5 %)	2/18 (11.1 %)	1/6 (16.7 %)	0.6209
Geny					
- *IL2RG*	10/42 (23.8 %)	7/17 (41.2 %)	3/19 (15.8 %)	0/6 (0 %)	
- *JAK3*	6/42 (14.3 %)	3/17 (17.6 %)	2/19 (10.5 %)	1/6 (16.7 %)	
- *ADA*	5/42 (11.9 %)	2/17 (11.8 %)	3/19 (15.8 %)	0/6 (0 %)	0.0695
- *RAG1*	3/42 (7.1 %)	0/17 (0%)	3/19 (15.8 %)	0/6 (0 %)	
- *RAG2*	4/42 (9.5 %)	0/17 (0 %)	3/19 (15.8 %)	1/6 (16.7 %)	
- *IL7RA*	2/42 (4.8 %)	2/17 (11.8 %)	0/19 (0 %)	0/6 (0 %)	
- *Lig1*	1/42 (2.4 %)	0/17 (0 %)	0/19 (0 %)	1/6 (16.7 %)	
- brak	11/42 (26.2 %)	3/17 (17.6 %)	5/19 (26.3 %)	3/6 (50 %)	

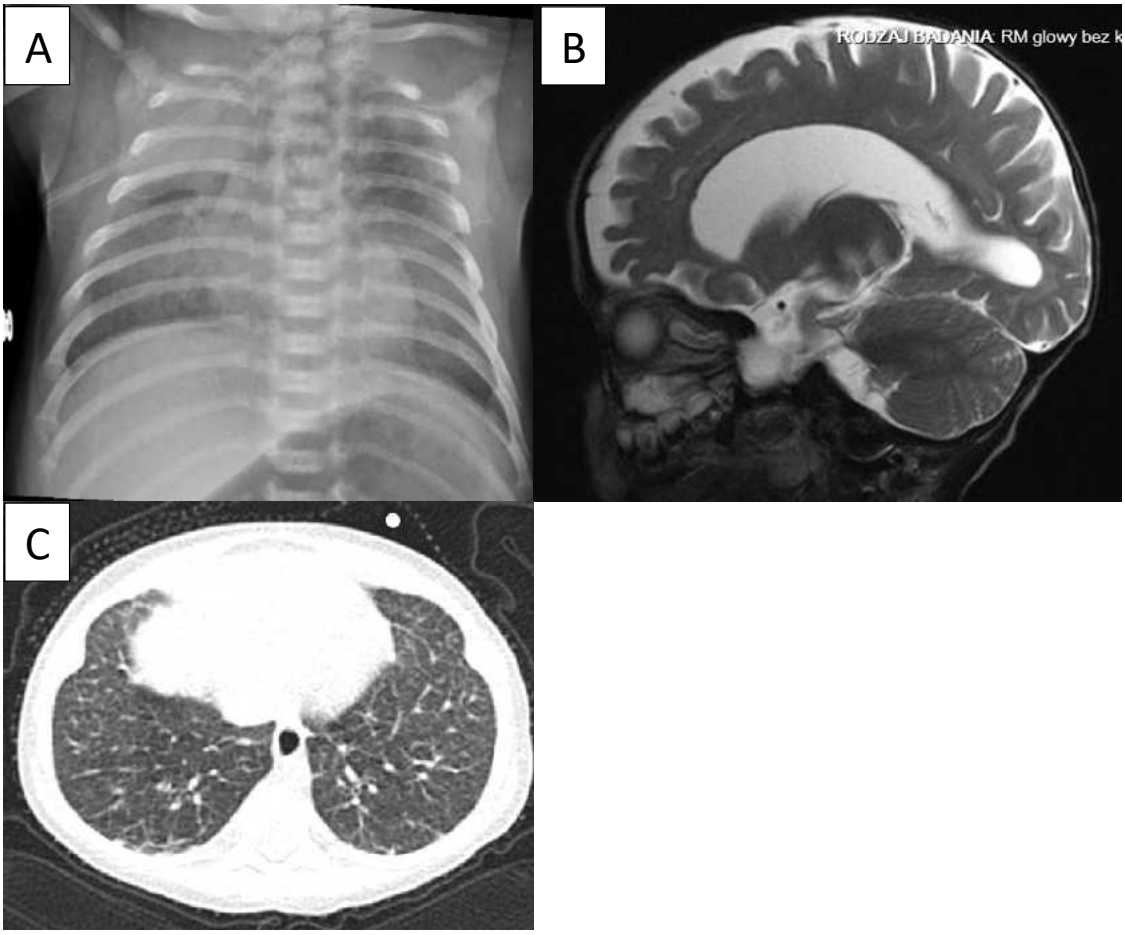
Tabela 3. Podejrzenie SCID według kierujących specjalistów

Specjalista podejrzewający SCID	Liczba pacjentów	Wiek diagnozy w miesiącach: mediana (zakres)	Opóźnienie diagnozy w miesiącach: mediana (zakres)	Liczba pacjentów z TS/AS/OS
Pediatra	16 (44%)	5 (2-37)	2 (0-19)	9/7/1
Hematolog	7 (19%)	21 (2-48)	20 (1-42)	1/5/1
Dermatolog	3 (8%)	3 (2-3)	1 (1-2)	0/0/3
Gastroenterolog	2 (6%)	16 (14-19)	9 (6-13)	0/2/0
Anestezjolog/neonatolog	4 (11%)	7 (4-9)	1 (0-1)	0/4/0
Kardiolog	1 (3%)	4	1	0/1/0
Specjalista ch. zakaźnych	1 (3%)	8	1	1/0/0
Pulmonolog	1 (3%)	8	7	0/1/0
Nefrolog	1 (3%)	15	13	0/1/0
Razem	36	6; 2-48	2; 0-42	12/19/5

Tabela 4. Wiek pojawienia się objawów oraz diagnozy, m – miesiące, tyg - tygodnie

Pacjent	Płeć	Limfo-penia	Neutro-penia	AT	Zap. płuc	Hepato-megalia	Infekcje	Wiek diagnozy SCID	Wiek diagnozy ADA
P1	K	15 m	13 m	15 m	6 m	Nie	Nie	13 m	21 m
P2	M	15 m	15m	15 m	2x	16 m	CMV 2.5 lat	27 m	27 m
P3	M	14 m	15 m	15 m	15 m	15 m	VZV 3 m CMV 15 m PJP 15 m	15 m	16 m
P4	M	2.5 m	2.5 m	2,5 m	3 m	6 m	No	3 m	6 m
P5	K	7 tyg	7 tyg	7 tyg	7 tyg	Nie	BCG 5 m	2 m	3 m
P6	M	2 tyg	2 tyg	3 tyg	2 tyg	Nie	BCG 2 m	7 tyg	8 tyg
P7	M	5 tyg	5 tyg	7 tyg	5tyg	Nie	PJP 5 tyg BCG 3 m	6 tyg	7 tyg

Rycina 1. Objawy ADA-SCID: (A) RTG klatki piersiowej: ostry kąt łopatki oraz poszerzenia połączeń chrzęstno-kostnych żeber u pacjenta 6. (B) zmiany zanikowe w badaniu mózgu metodą rezonansu magnetycznego u pacjenta P3. (C) zmiany zapalne o typie matowej szyby oraz dyskretne pogrubienie przegród międzyzrazikowych podopłucnowo w badaniu tomografii komputerowej klatki piersiowej u pacjenta P5



Rycina 2. Miejscowe zakażenie BCG u pacjenta 5: (A) przed ETZ, (B) 4 tygodnie ETZ, (C) 7 tygodni ETZ

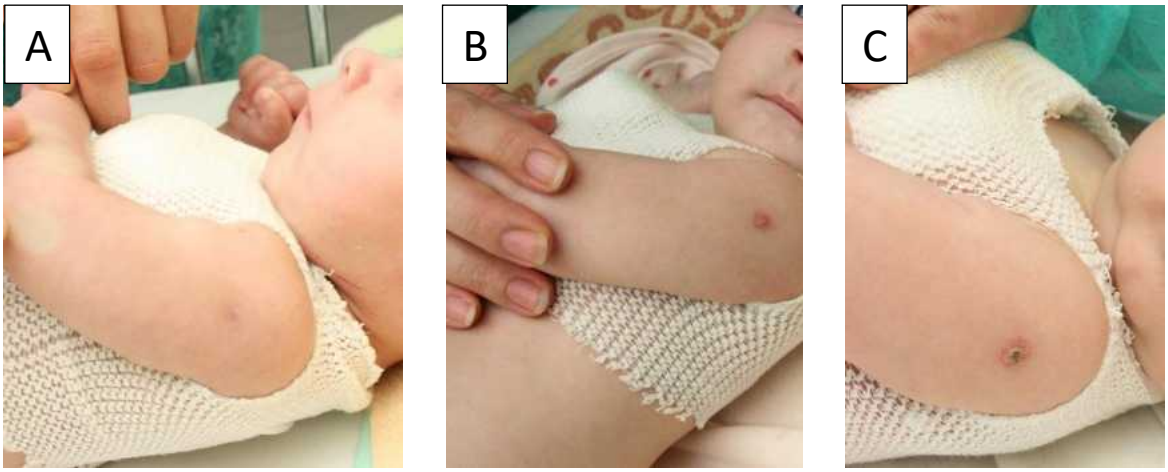
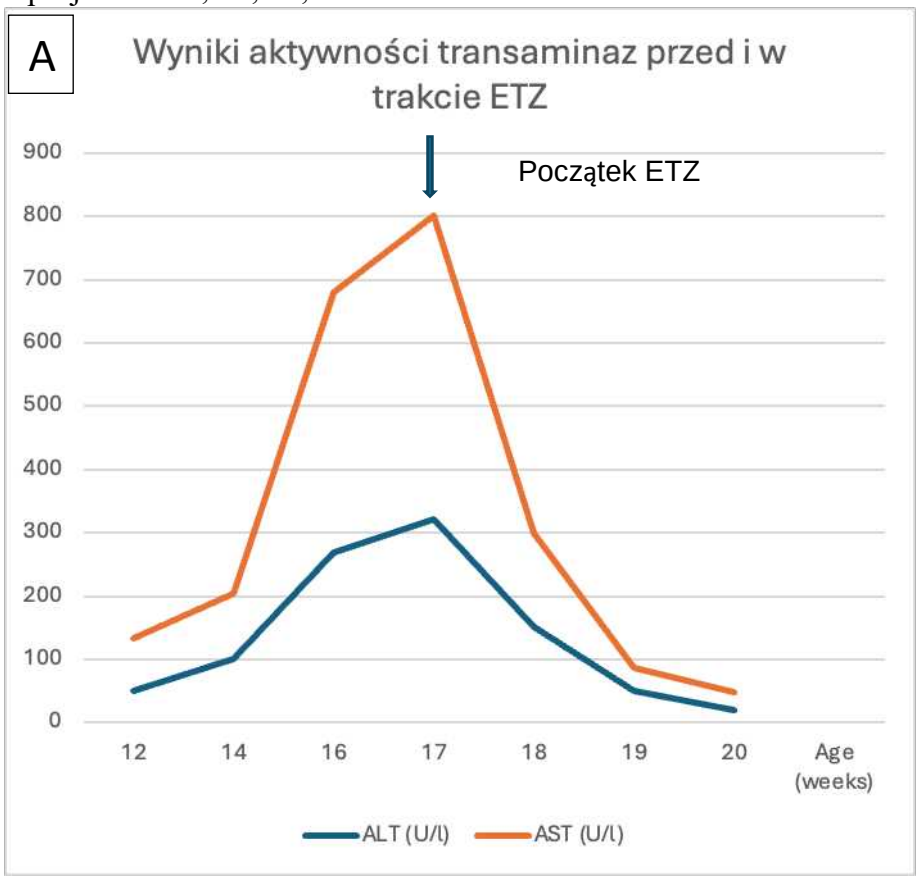


Tabela 5. Wyniki badań laboratoryjnych w momencie diagnozy SCID oraz aktywność ADA (nmol/mg Hb/h) i wyniki badań genetycznych, N – prawidłowe, L – obniżone, H – wysokie, k - komórki

Pt	WBC (K/µl)	ALC (K/µl)	AST (U/l)	ALT (U/l)	IgG (g/l)	IgA (g/l)	IgM (g/l)	CD3 (k/µl)	CD4 (k/µl)	CD8 (k/µl)	CD19 (k/µl)	CD16+56 (k/µl)	RTE (%)	ADA	Wariant w genie ADA
P1	2,64 (L)	0.21 (L)	85 (H)	59 (H)	3.39 (N)	0.08 (N)	0.315 (N)	65 (L)	42 (L)	21 (L)	14 (L)	70 (L)	Nd	N	c.80T>A(;) 646G>A p.Ile27Asn(;) Gly216Arg
P2	2 (L)	0.58 (L)	180 (H)	141 (H)	3.84 (L)	0.41 (N)	0.39 (N)	714 (L)	107 (L)	618 (L)	24 (L)	25 (L)	5.4 (L)	0.63 (L)	Nie wykryto
P3	1.9 (L)	0.34 (L)	56 (H)	21 (N)	4.75 (N)	<0.06 (L)	<0.04 (L)	50 (L)	1 (L)	49 (L)	1 (L)	11 (L)	0 (L)	Nd	homozygota c.302G>A p.Arg101Gln
P4	1.56 (L)	0.17 (L)	225 (H)	38 (N)	3.9 (N)	0.4 (N)	1.11 (N)	39 (L)	33 (L)	2 (L)	42 (L)	17 (L)		Nd	homozygota c.302G>A p.Arg101Gln
P5	1.7 (L)	0.25 (L)	133 (H)	51 (N)	6.92 (H)	0.36 (N)	1.32 (H)	158 (L)	71 (L)	73 (L)	3 (L)	64 (L)	9.8 (L)	0.109 (L)	c.302G>A(;) 956_960delAAGAG p.Arg101Gln(;) Glu319Glyfs
P6	3.12 (L)	0.14 (L)	67 (N)	31 (N)	8.54 (4 d IVIG)	0.07 (N)	<0.04 (L)	35 (L)	31 (L)	4 (L)	2 (L)	5 (L)	0 (L)	4.9 (L)	c.363-3C>G(;) 778G>A p.(?)(;) Glu260Lys
P7	1.22 (L)	0.04 (L)	67 (N)	29 (N)	2.1 (L)	<0.07 (N)	0.08 (L)	27 (L)	20 (L)	7 (L)	3 (L)	22 (L)	0 (L)	0 (L)	c.956_960del(;) del ex 2: chr20: 44636227-44636288 p.Glu319Glyfs(;)

Rycina 3. Wyniki (A) aktywności transaminaz u pacjenta P5 i (B) liczby limfocytów u pacjentów P2, P5, P6, P7 w trakcie ETZ



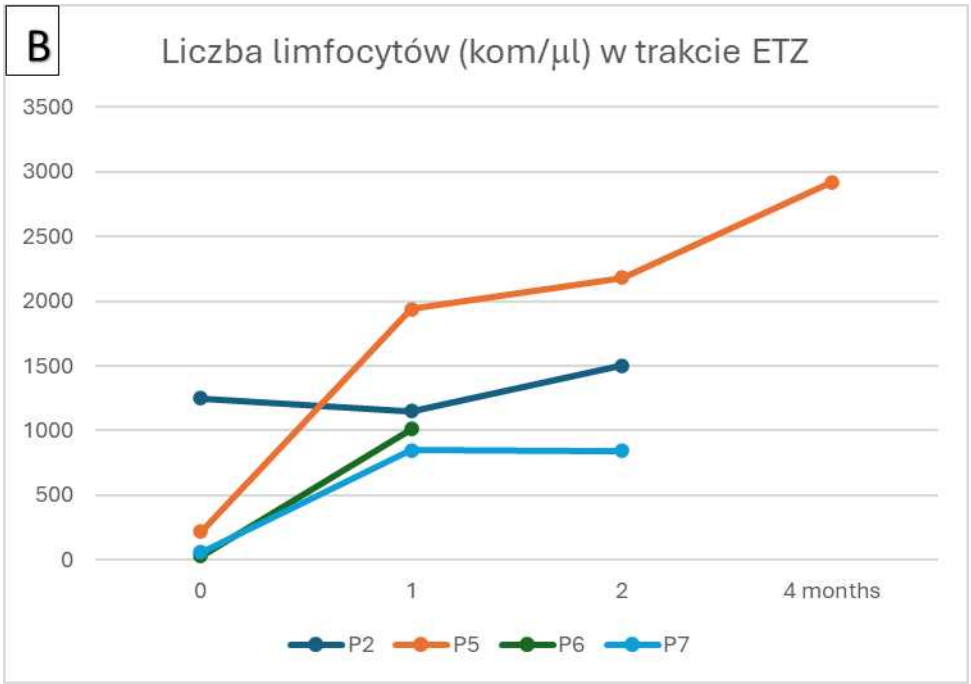
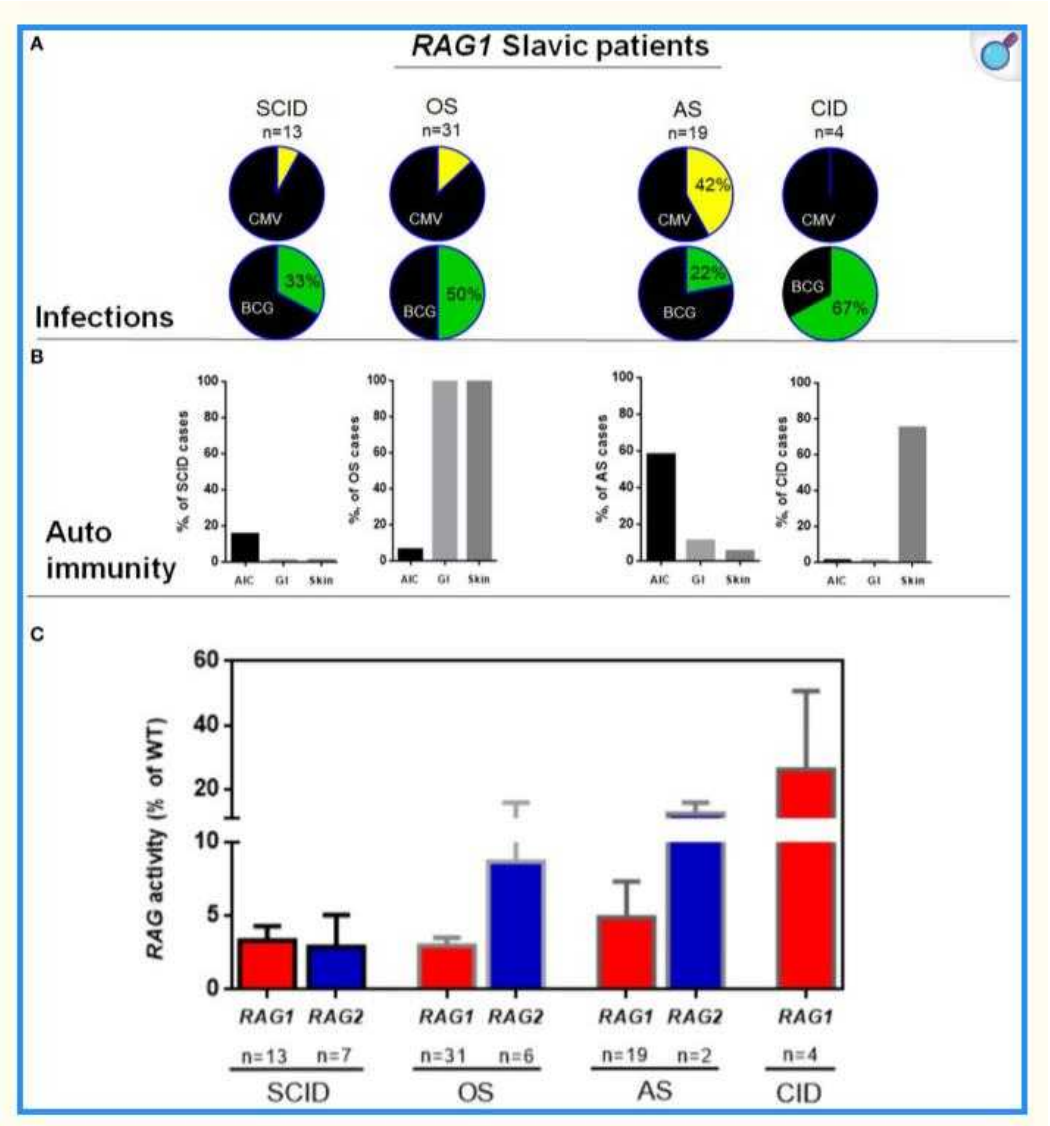


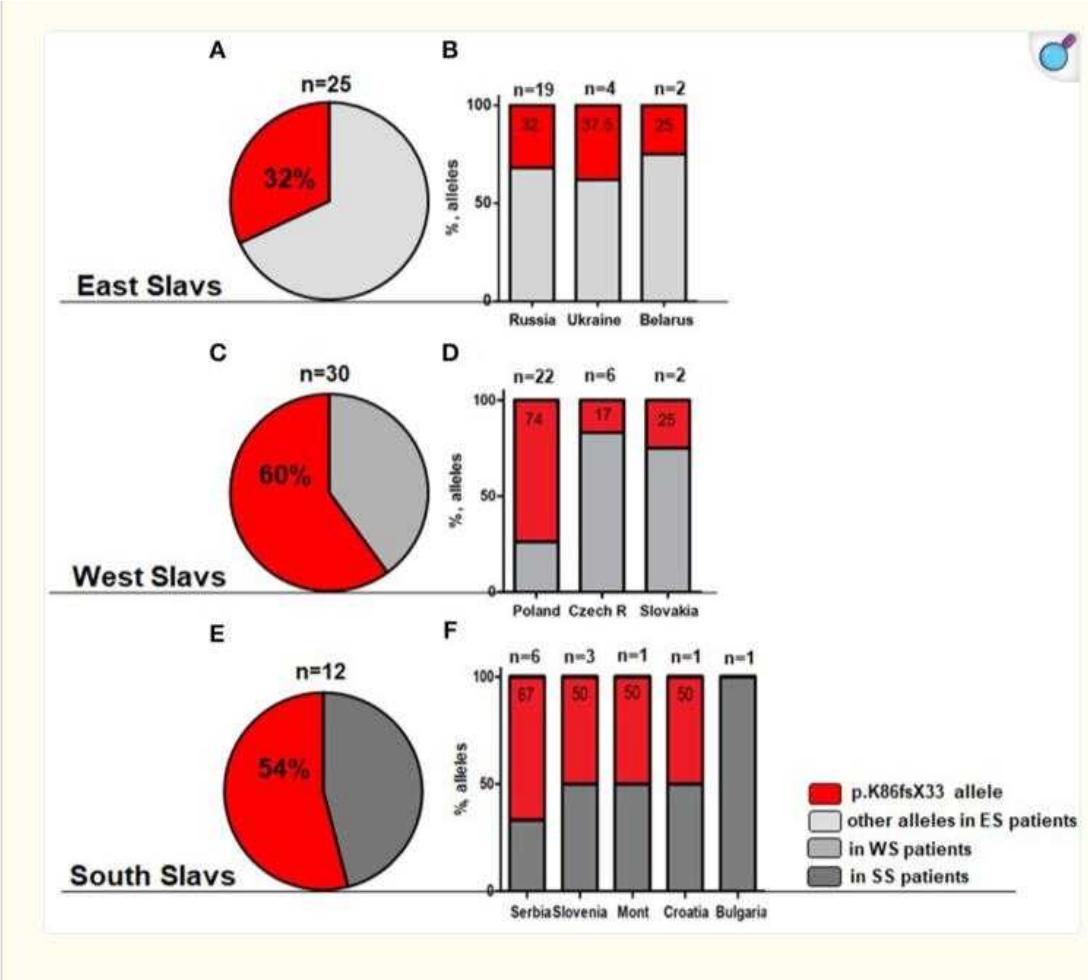
Tabela 6. Leczenie ETZ i HSCT. m – miesiace, tyg - tygodnie

P	Wiek włączenia ETZ	Czas ETZ (tyg)	Wiek HSCT (miesiące)	Dawca	Kondycjonowanie	CD34+/kgx 10*6	Powikłania	Leczenie BCG
P1	Nie	Nie	16	MSD	Nie	6,55	Nie	Nie
P2	28m	12	33	MSD	Bu-Flu	4,28	Nadciśnienie tętnicze, gorączka, CMV	Nie
P3	Nie	Nie	Nie	Nie	-	-	-	Nie
P4	Nie	Nie	7	MUD	Treo-flud	4,04	Nie	Nie
P5	4m	23	9	MUD	BuxFlu	4,6	Zap jamy ustnej III st, nadciśnienie tetnicze	INH+RMP
P6	8 tyg	6	4	Hapl	Treo-flu-tiotepa	18,72	Zap jamy ustnej aGVHD st.2, AIHA, retransplantacja od tego samego dawcy (08.2022)	INH+RMP
P7	10 tyg	9	4,5	MUD	Treo-flu-tiotepa		aGVHD st 2, AIHA	INH+RMP

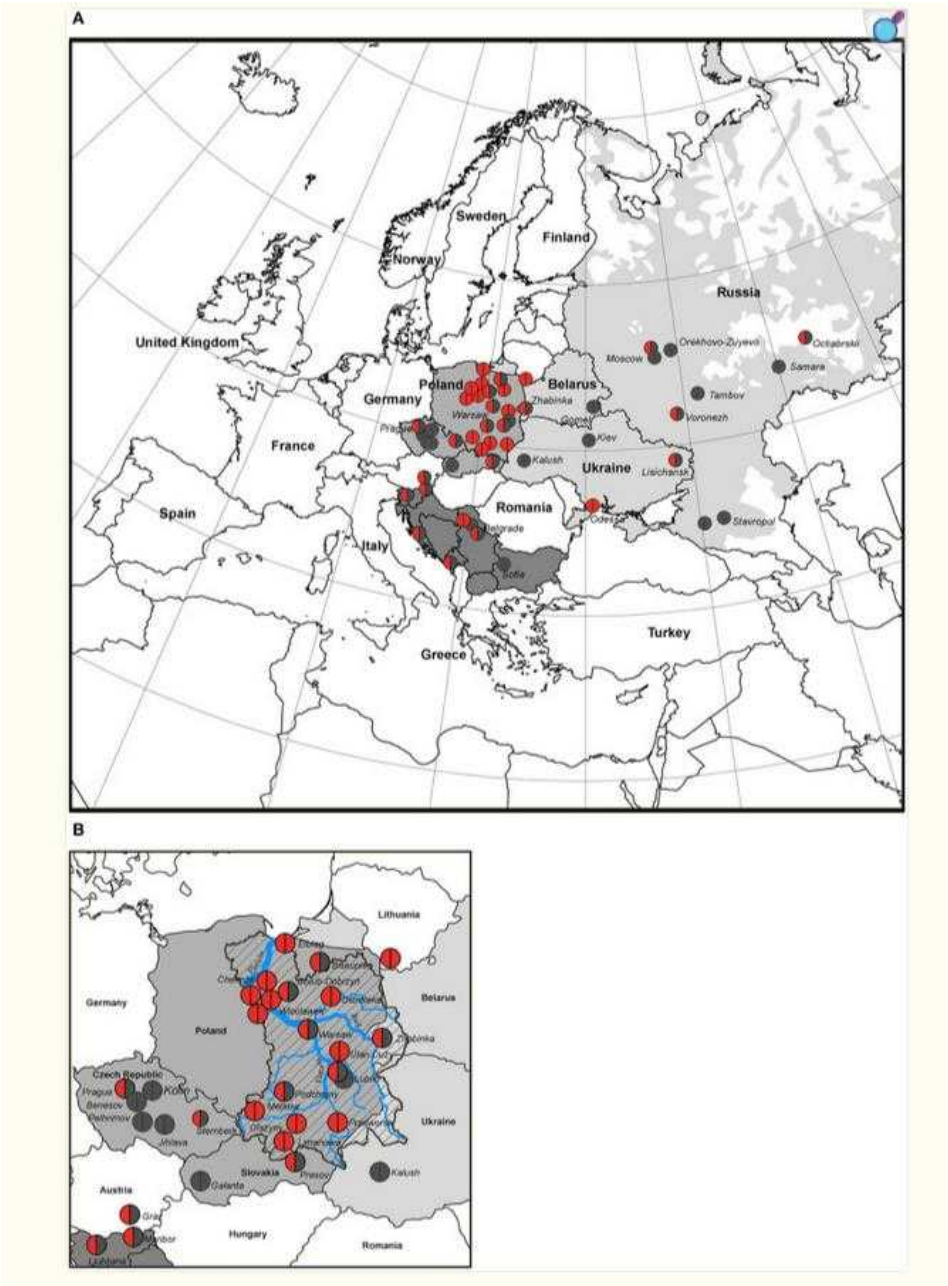
Rycina 4. Charakterystyka pacjentów z deficytem RAG. (A) Powikłania infekcyjne u pacjentów z wariantami w genie *RAG1*: CMV I BCG. (B) Częstość powikłań autoimmunizacyjnych u pacjentów z wariantami w genie *RAG1*. (C) Aktywność rekombinazy u pacjentów z wariantami w *RAG1/RAG2*.



Rycina 5. Częstość występowania allelu c.256_257delAA (p.K86Vfs*33) u pacjentów z wariantami w genie *RAG1*. (A,B) Jasnoszary – Słowianie Wschodni (East Slavs - ES); (C,D) Szary – Słowianie Zachodni (West Slavs - WS); (E,F) Ciemnoszary – Słowianie Południowi (South Slavs - SS); (B,D,F) odsetek pacjentów z wariantem p.K86Vfs*33



Rycina 6. Mapa rozkładu rodzin z wariantami w *RAG1* p.K86Vfs*33. (A) Miejsce urodzenia pacjenta jest zaznaczone kołem: warianty homozygotyczne p.K86Vfs*33 czerwonym; warianty heterozygotyczne p.K86Vfs*33 czerwono-szarym, inne warianty szarym. (B) Mapa Słowian Zachodnich; na mapę Polski jest naniesione dorzecze Wisły: niebieska linia to Wisła, strefa oznaczona ukośną czarną linią – dorzecze Wisły - obszar geograficzny pokrywający się z regionem największej koncentracji rodzin, w których urodzili się pacjenci z homozygotycznymi wariantami p.K86Vfs*33.



Rycina 7. Geograficzny obraz rozmieszczenia wariantu p.K86Vfs*33 wśród Słowian Wschodnich. Jasnoszara strefa na mapie Rosji to terytorium dominującego osadnictwa rosyjskiego

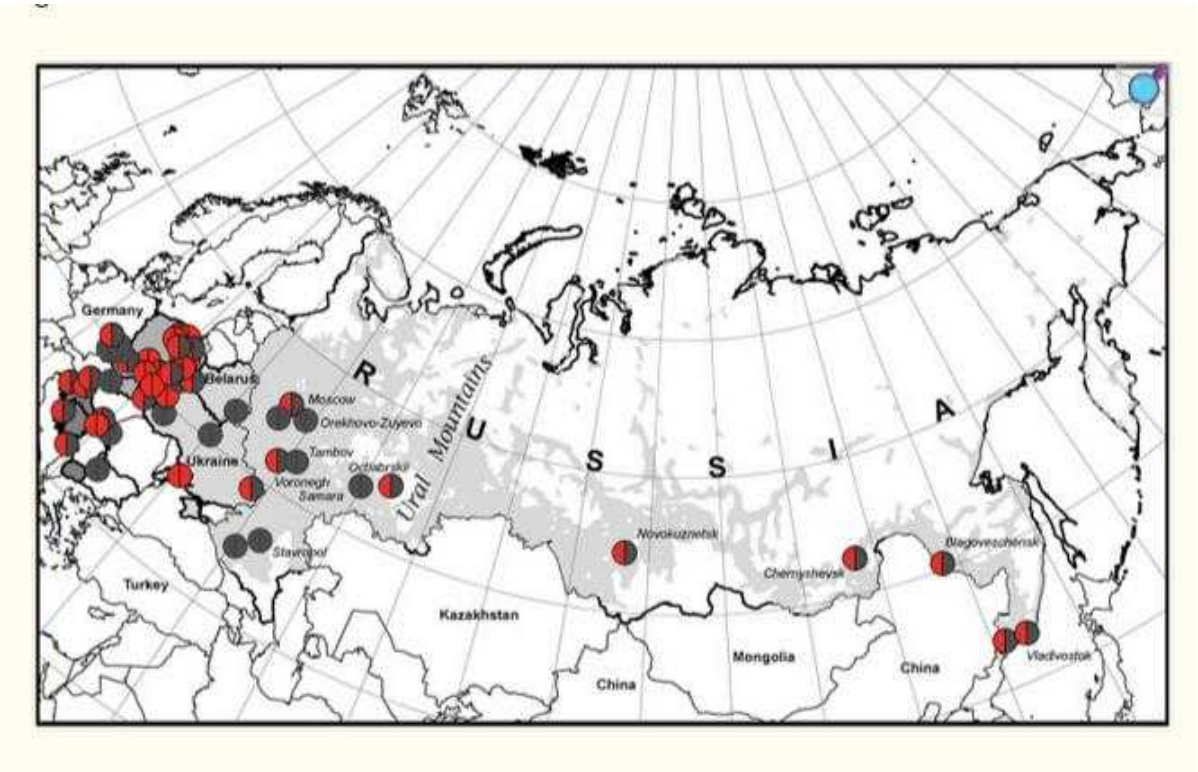
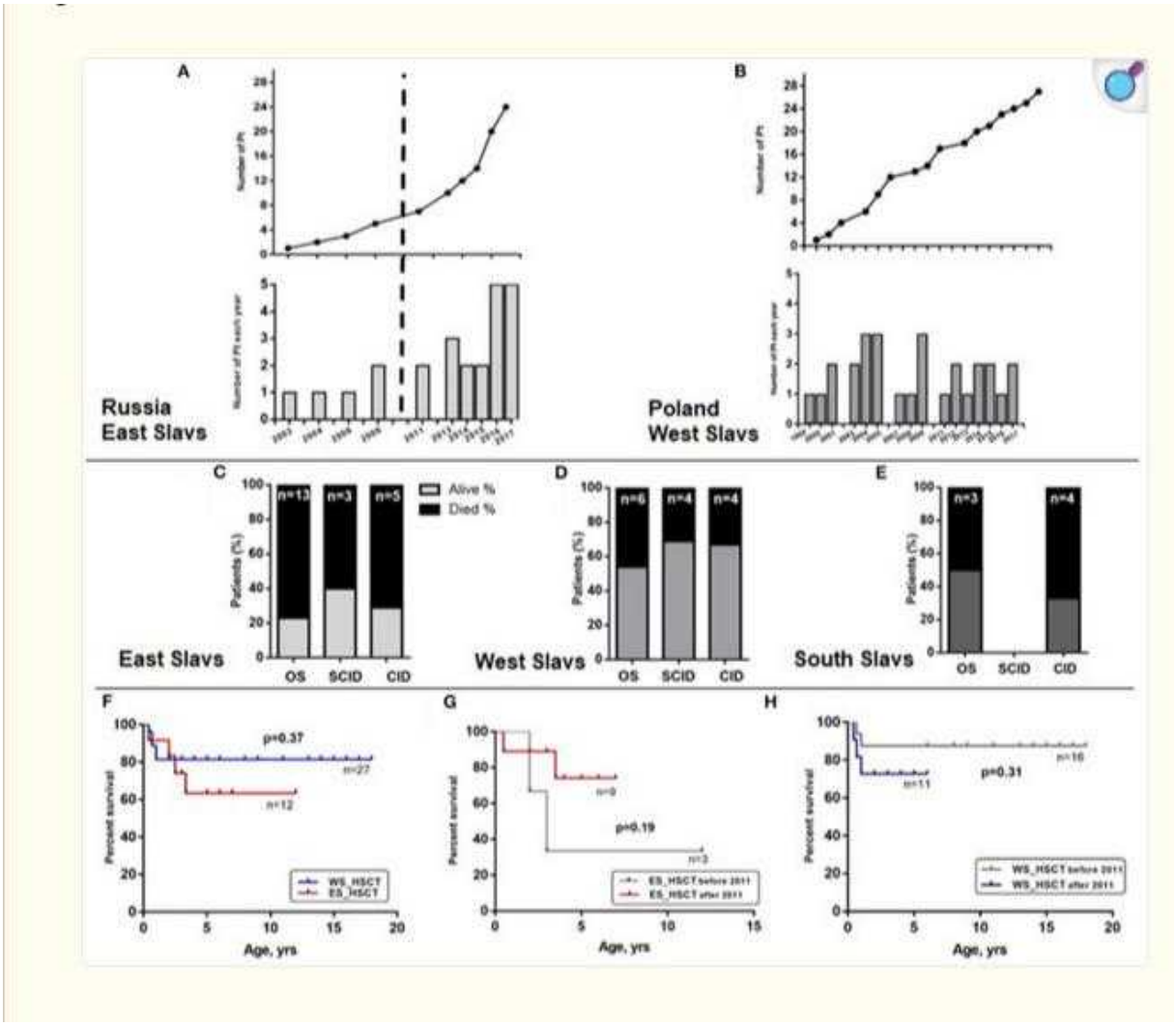


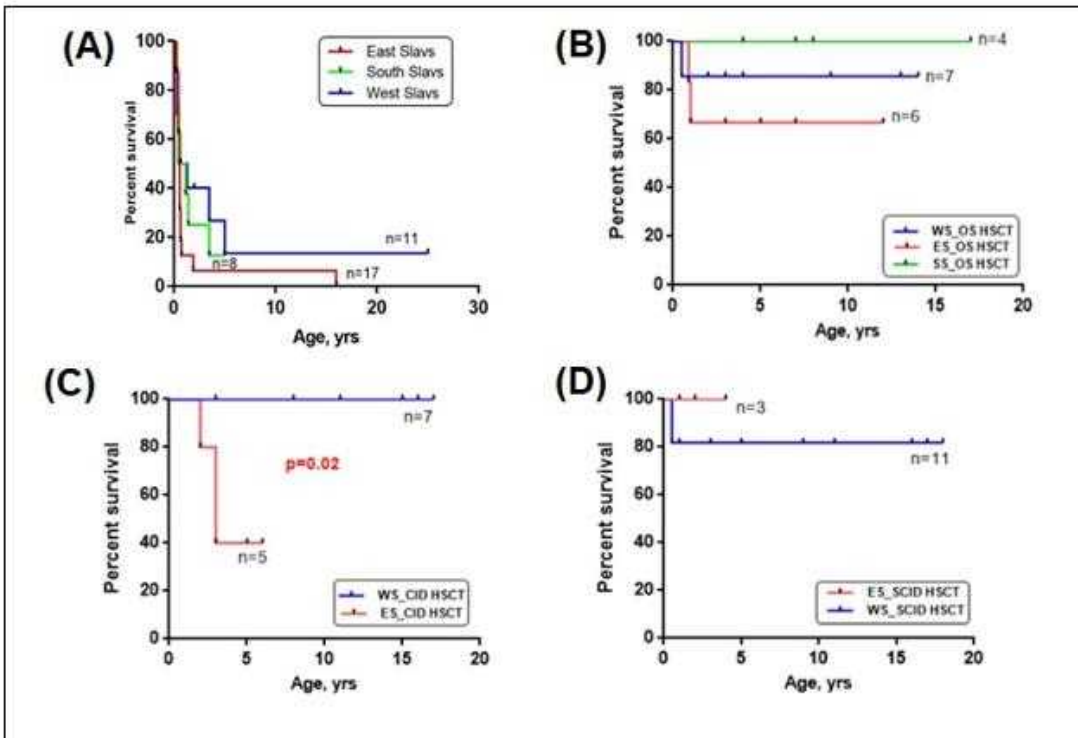
Tabela 7. Średnie roczne występowanie pacjentów z wariantami *RAG* w krajach słowiańskich

Kraj	Liczba pacjentów z RAG	Lata obserwacji	Liczba urodzeń w badanym czasie	Częstość występowania
Rosja	24	2002–2017	26 557 598	1:1 106 566
Ukraina	4	2004–2013	4 834 300	1:1 208 575
Białoruś	2	1998–2009	1 145 223	1:572 611
Polska	28	1999–2017	7 201 693	1:257 203
Czechy	8	1993–2016	2 395 156	1:299 395
Słowacja	2	2007–2015	515 219	1:257 609
Serbia	6	1992–2011	1 529 226	1:254 871
Słowenia	3	2003–2013	223 206	1:74 402
Czarnogóra	1	1995	9 492	-
Chorwacja	1	2010	43 361	-
Bułgaria	1	2013	66 578	-

Rycina 8. Identyfikacja i przeżycie pacjentów słowiańskich. Liczba pacjentów zdiagnozowanych w Rosji (A) i Polsce (B). Odsetek zmarłych pacjentów (obszar czarny) w grupach klinicznych pacjentów z wariantami RAG oraz pochodzenia wschodniosłowiańskiego (C), zachodniosłowiańskiego (D) lub południowosłowiańskiego (E). Całkowite przeżycie przedstawione jako krzywa przeżycia Kaplana-Meiera dla grup pacjentów z WS i ES z przeszczepieniem macierzystych komórek krwiotwórczych (HCT) (F). Krzywa przeżycia całkowitego pacjentów z ES (G) i WS (H) po przeszczepieniu przed i po 2011 roku.



Rycina 9. Całkowite przeżycie przedstawione jako krzywa przeżycia Kaplana-Meiera dla grup pacjentów z bez HSCT (A) oraz porównanie przeżycia pacjentów z OS (B), z CID (C), ze SCID (D) po HSCT



Rycina 10. Początkowy obraz kliniczny i cechy diagnostyczne. (A) Bogatokomórkowy szpik kostny z zahamowaną linią erytro i limfoblastyczną. (B) Zmiany skórne rumieniowo-złuszczające

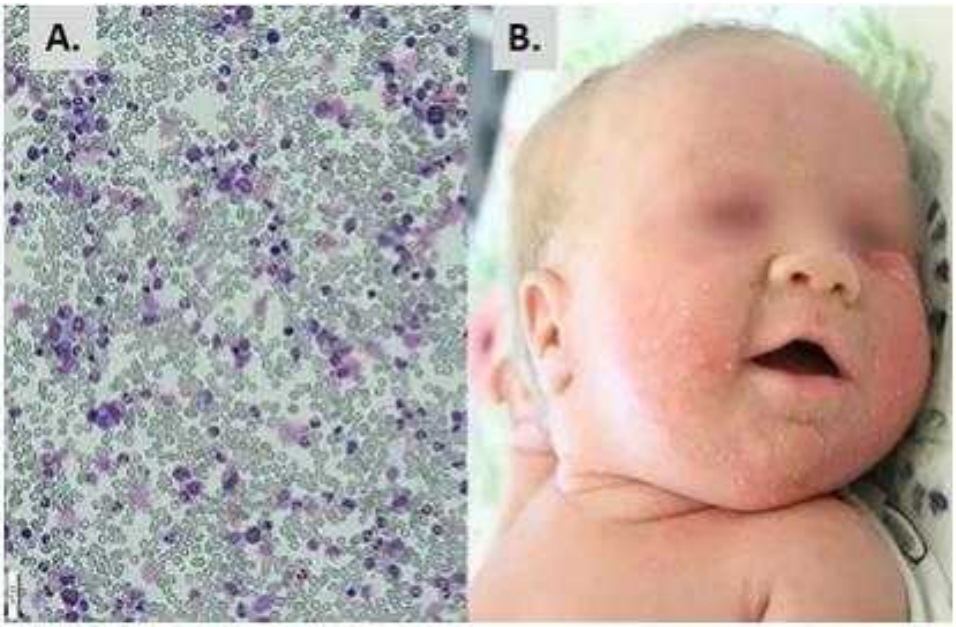
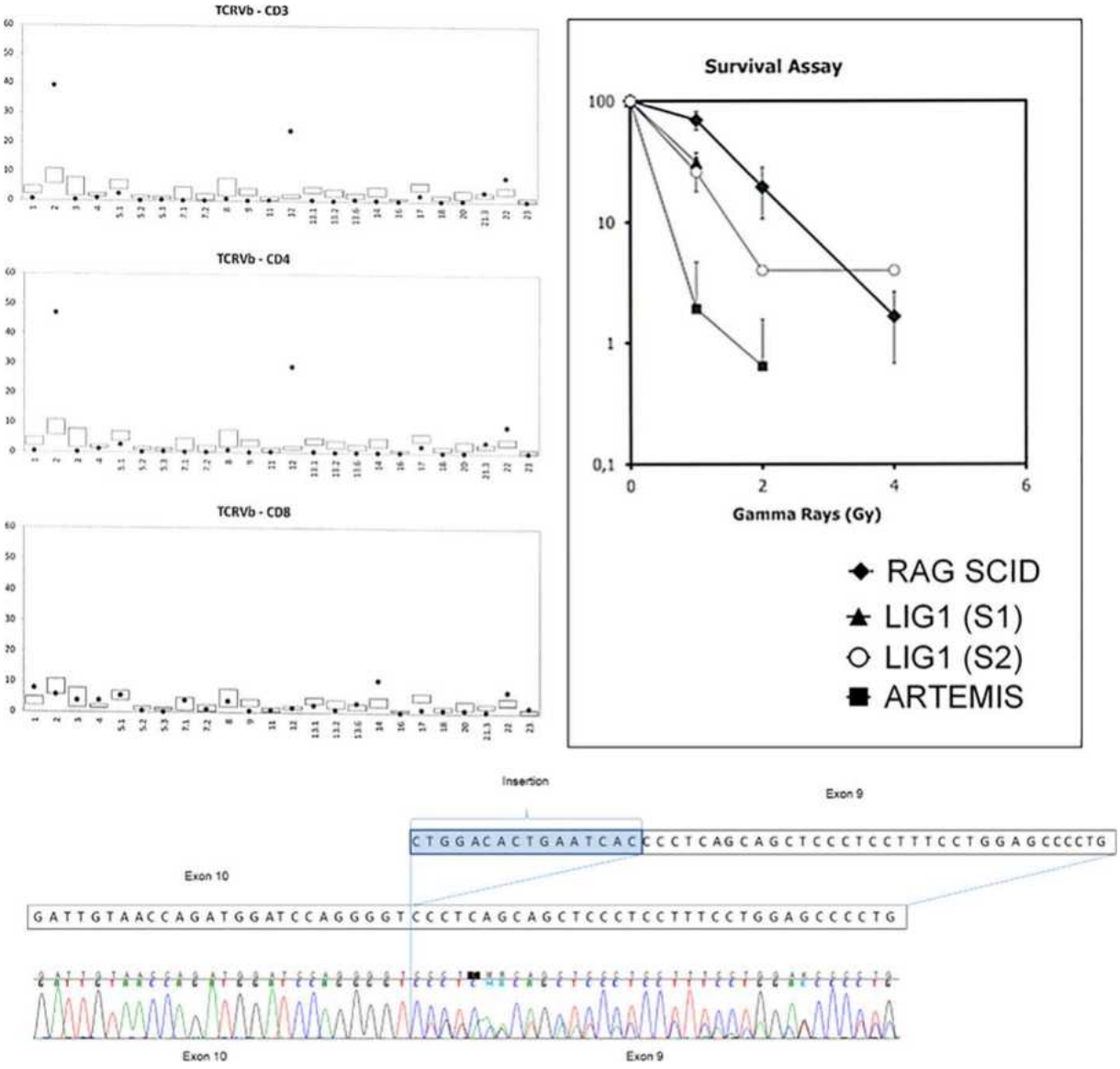


Tabela 8. Wyniki badań laboratoryjnych w momencie postawienia rozpoznania

Parametr	Wynik	Prawidłowe wartości referencyjne dla wieku
CD45+	313 komórki/µl	3800-8100 komórki/µl
CD3+	106 komórki/µl	2200-5500 komórki/µl
CD3+CD4+	87 komórki/µl	1400-4200 komórki/µl
CD3+CD8+	5 komórki/µl	400-1400 komórki/µl
CD19+	107 komórki/µl	700-1800 komórki/µl
CD56+	84 komórki/µl	200-980 komórki/µl
CD31+CD45RA+/CD3+CD4+	0%	50-74%
Limfocyty T gamma/delta (%T)	18,9%	3,2-4,9%
IgG	5.96 g/l (1 dzień po IVIG)	3.36-10.5 g/l
IgM	<0.04 g/l	0.21-0.51 g/l
IgA	<0.07 g/l	<0.06-0.07 g/l
IgE	<2.00 kIU/L	
Test transformacji blastycznej		
PHA	1705 ± 56 cpm	>16000 cpm
	11.0 SI	>65 SI
anty-CD3	2494 ± 159 cpm,	>15000 cpm
	16 SI	>60 SI
Pansorbin	20646 ± 224 cpm	>2000 cpm
	133 SI	>5SI
Mikrobiologia		
Wymaz z nosa	*Staphylococcus aureus* MSSA, *Klebsiella pneumoniae*	
Wymaz z gardła	Flora fizjologiczna	
Wymaz z odbytu	Flora fizjologiczna	
Badanie kału	W posiewie kału flora fizjologiczna, Salmonella, Shigella ujemne, Norowirus i adenowirus ujemne, Rotawirus dodatni przez 4 dni	
Wymaz ze spojówek	*Staphylococcus aureus* MSSA	
Wymaz z przewodu słuchowego zewnętrznego	*Staphylococcus aureus* MSSA, *Escherichia coli* ESBL/-/	
PCR z krwi w kierunku CMV, EBV, HSV-1/2, Enterovirus, Human paraechovirus, HHV-6, HHV-7, Parvovirus B19	ujemny	
Galaktomannan i mannan w surowicy	ujemne	

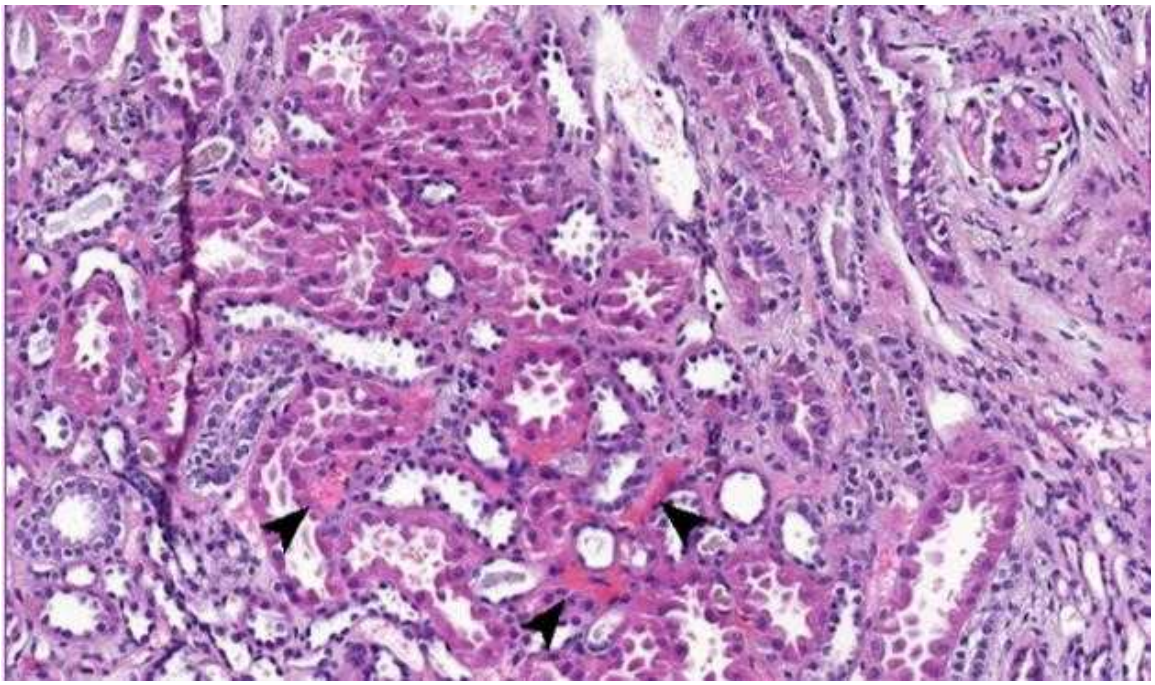
Rycina 11. Testy diagnostyczne u pacjentów z niedoborem LIG1. (A) Dystrybucja łańcucha Vβ receptora TCR jest oligoklonalna ze znacząco zwiększonym odsetkiem łańcuchów Vβ2 i Vβ12 wśród limfocytów CD4. (B) Wyniki testu radiowrażliwości. Fibroblasty wyhodowane z biopsji skóry pacjenta i pacjenta z niedoborem Artemis w przebiegu SCID poddano działaniu wzrastającej dawki promieniowania, a odsetek przeżycia (oś Y) określono po 6 dniach. S1 – próbka 1, S2 – próbka 2. Próbka pacjenta z SCID RAG1 została wykorzystana jako kontrola. (C) Wyniki sekwencjonowania cDNA ukazujące wariant miejsca splicingu w LIG1, który prowadzi do insercji szesnastu nukleotydów w eksonie 9, skutkując przesunięciem ramki odczytu i przedwczesną terminacją białka w pozycji 260.



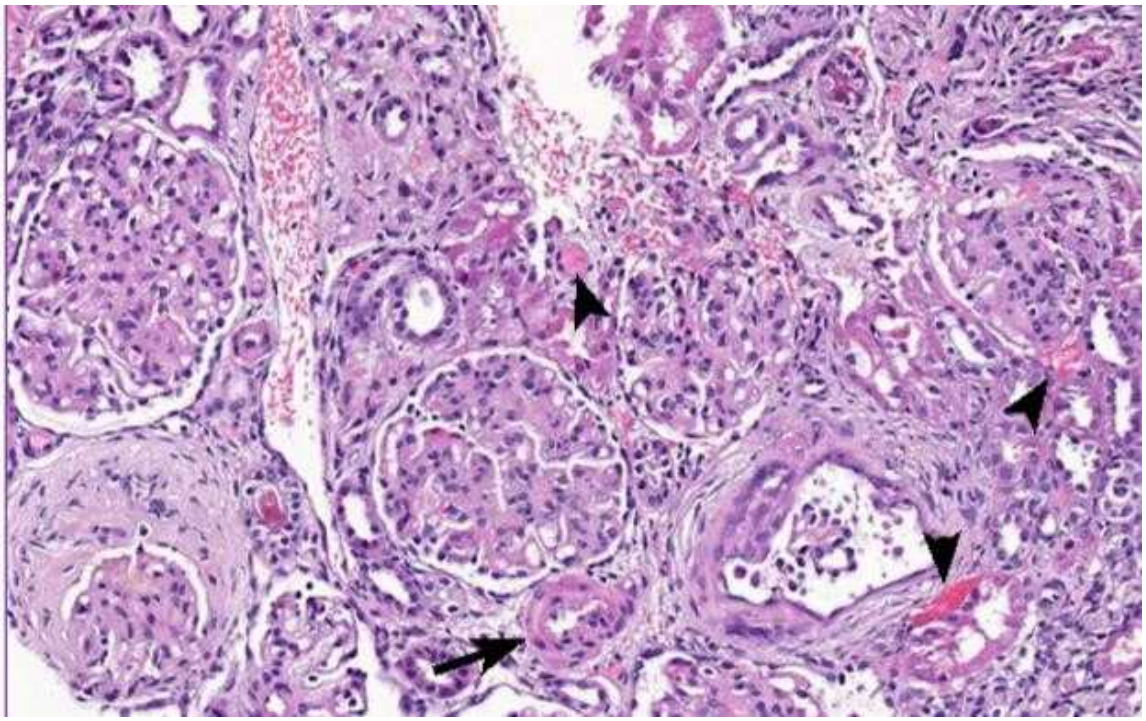
Rycina 12. Ciężki przebieg zakażenia *Varicella Zoster* w opisanym przypadku



Rycina 13. Mikrozakrzepy (strzałki)



Rycina 14. Powiększenie kłębuszka, któremu towarzyszy przyrost macierzy zewnątrzkomórkowej. Mikrozakrzepy (strzałka). Mikroarteriole z grubą ścianą (strzałka).



XII. Piśmiennictwo

1. Kwan A, Abraham RS, Currier R i wsp. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. JAMA. 2014 Aug 20;312(7):729-38. doi: 10.1001/jama.2014.9132. Erratum in: JAMA. 2014 Nov 26;312(20):2169. Bonagura, Vincent R [Added]. PMID: 25138334; PMCID: PMC4492158.
2. Speckmann C, Nennstiel U, Hönig M i wsp. Prospective Newborn Screening for SCID in Germany: A First Analysis by the Pediatric Immunology Working Group (API). J Clin Immunol. 2023 Feb 27:1–14. doi: 10.1007/s10875-023-01450-6. Epub ahead of print. PMID: 36843153; PMCID: PMC9968632.
3. Al-Mousa H, Al-Dakheel G, Jabr A i wsp. High Incidence of Severe Combined Immunodeficiency Disease in Saudi Arabia Detected Through Combined T Cell Receptor Excision Circle and Next Generation Sequencing of Newborn Dried Blood Spots. Front Immunol. 2018 Apr 16;9:782. doi: 10.3389/fimmu.2018.00782. PMID: 29713328; PMCID: PMC5911483.
4. Al Sukaiti N, Ahmed K, Alshekaili J i wsp. A Decade Experience on Severe Combined Immunodeficiency Phenotype in Oman, Bridging to Newborn Screening. Front Immunol. 2021 Jan 15;11:623199. doi: 10.3389/fimmu.2020.623199. PMID: 33519828; PMCID: PMC7844122.
5. Shearer WT, Dunn E, Notarangelo LD i wsp. Establishing diagnostic criteria for severe combined immunodeficiency disease (SCID), leaky SCID, and Omenn syndrome: the Primary Immune Deficiency Treatment Consortium experience. J Allergy Clin Immunol. 2014 Apr;133(4):1092-8. doi: 10.1016/j.jaci.2013.09.044. Epub 2013 Nov 28. PMID: 24290292; PMCID: PMC3972266.
6. Lev A, Sharir I, Simon AJ i wsp. Lessons Learned From Five Years of Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in Israel. J Allergy Clin Immunol Pract. 2022 Oct;10(10):2722-2731.e9. doi: 10.1016/j.jaip.2022.04.013. Epub 2022 Apr 26. PMID: 35487367.
7. Dvorak CC, Haddad E, Heimall J i wsp. The diagnosis of severe combined immunodeficiency (SCID): The Primary Immune Deficiency Treatment Consortium (PIDTC) 2022 Definitions. J Allergy Clin Immunol. 2023 Feb;151(2):539-546. doi: 10.1016/j.jaci.2022.10.022. Epub 2022 Nov 28. PMID: 36456361; PMCID: PMC9905311.

8. Gaspar HB, Aiuti A, Porta F i wsp. How I treat ADA deficiency. Blood. 2009 Oct 22;114(17):3524-32. doi: 10.1182/blood-2009-06-189209. Epub 2009 Jul 28. PMID: 19638621; PMCID: PMC2766674.
9. Pai SY, Logan BR, Griffith LM i wsp. Transplantation outcomes for severe combined immunodeficiency, 2000-2009. N Engl J Med. 2014 Jul 31;371(5):434-46. doi: 10.1056/NEJMoa1401177. PMID: 25075835; PMCID: PMC4183064.
10. Vignesh P, Rawat A, Kumrah R I wsp. Clinical, Immunological, and Molecular Features of Severe Combined Immune Deficiency: A Multi-Institutional Experience From India. Front Immunol. 2021 Feb 8;11:619146. doi: 10.3389/fimmu.2020.619146. PMID: 33628209; PMCID: PMC7897653
11. Marciano BE, Huang CY, Joshi G I wsp. BCG vaccination in patients with severe combined immunodeficiency: complications, risks, and vaccination policies. J Allergy Clin Immunol. 2014 Apr;133(4):1134-41. doi: 10.1016/j.jaci.2014.02.028. Erratum in: J Allergy Clin Immunol. 2014 Jul;134(1):244. PMID: 24679470; PMCID: PMC4015464.
12. Cirillo E, Cancrini C, Azzari C i wsp. Clinical, Immunological, and Molecular Features of Typical and Atypical Severe Combined Immunodeficiency: Report of the Italian Primary Immunodeficiency Network. Front Immunol. 2019 Aug 13;10:1908. doi: 10.3389/fimmu.2019.01908. PMID: 31456805; PMCID: PMC6700292.
13. Piątosa B, Wolska-Kusnierz B, Siewiera K i wsp. Distribution of leukocyte and lymphocyte subsets in peripheral blood. Age related normal values for preliminary evaluation of the immune status in Polish children. Centr Eur J Immunol [Internet] 2010;35:168–75.
14. Abraham RS, Basu A, Heimall JR i wsp. Relevance of lymphocyte proliferation to PHA in severe combined immunodeficiency (SCID) and T cell lymphopenia. Clin Immunol. 2024 Apr;261:109942. doi: 10.1016/j.clim.2024.109942. Epub 2024 Feb 15. PMID: 38367737; PMCID: PMC11018339.
15. Pichler, WJ, Tilch, J, 2004. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. Allergy 59, 809–820
16. Wolska- Kuśnierz B, Gregorek H, Zapaśnik A i wsp. Wartości referencyjne stężeń immunoglobulin G, A, M i D w surowicy zdrowych dzieci i osób dorosłych, mieszkańców województwa mazowieckiego. Standardy Med. 2010;7(3):524-532
17. Kreins AY, Dhalla F, Flinn AM i wsp.; European Society for Immunodeficiencies Clinical Working Party. European Society for Immunodeficiencies guidelines for the

management of patients with congenital athymia. J Allergy Clin Immunol. 2024 Sep 18:S0091-6749(24)00980-1. doi: 10.1016/j.jaci.2024.07.031. Epub ahead of print. PMID: 39303894.

18. Bernatowska E, Wolska-Kuśnierz B, Pac M i wsp. Risk of BCG infection in primary immunodeficiency children. Proposal of diagnostic, prophylactic and therapeutic guidelines for disseminated BCG based on experience in the Department of Immunology, Children's Memorial Health Institute in Warsaw between 1980–2006. Centr Eur J Immunol 2007; 32: 221-225.
19. European Society for Immunodeficiences (ESID) Clinical Working Party Diagnostic Criteria for PID: BCG Diagnostic Criteria. Available from: https://archive.esid.org/Media/Files/BCG-diagnostic-criteria (dostęp: 14.04.2025)
20. Brown L, Xu-Bayford J, Allwood Z I wsp. Neonatal diagnosis of severe combined immunodeficiency leads to significantly improved survival outcome: the case for newborn screening. Blood 2011; 117: 3243-3246.
21. Blom M, Soomann M, Soler-Palacín P i wsp. Newborn screening for SCID and severe T lymphocytopenia in Europe. J Allergy Clin Immunol. 2024 Nov 6:S0091-6749(24)01162-X. doi: 10.1016/j.jaci.2024.10.018. Epub ahead of print. PMID: 39510364.
22. Giżewska M, Durda K, Winter T i wsp. Newborn Screening for SCID and Other Severe Primary Immunodeficiency in the Polish-German Transborder Area: Experience From the First 14 Months of Collaboration. Front. Immunol. 2020;11.
23. de Pagter AP, Bredius RG, Kuijpers TW i wsp. Dutch Working Party for Immunodeficiencies. Overview of 15-year severe combined immunodeficiency in the Netherlands: towards newborn blood spot screening. *Eur J Pediatr*. 2015, 174(9):1183-8. https://doi: 10.1007/s00431-015-2518-4.
24. Poyraz A, Cansever M, Muderris I i wsp. Neonatal Lymphopenia Screening Is Important for Early Diagnosis of Severe Combined Immunodeficiency. *Am J Perinatol*. 2023, 40(7):748-752. https://doi: 10.1055/s-0041-1731044.
25. Farmer JR, Foldvari Z, Ujhazi B i wsp. Outcomes and Treatment Strategies for Autoimmunity and Hyperinflammation in Patients with RAG Deficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019, 7(6):1970-1985.e4. https://doi: 10.1016/j.jaip.2019.02.038.
26. Min Q, Csomos K, Li Y i wsp. B cell abnormalities and autoantibody production in patients with partial RAG deficiency. *Front Immunol*. 2023, 14:1155380. https://doi:

10.3389/fimmu.2023.1155380.

27. Yao CM, Han XH, Zhang YD i wsp. Clinical characteristics and genetic profiles of 44 patients with severe combined immunodeficiency (SCID): report from Shanghai, China (2004-2011). *J Clin Immunol*. 2013, 33(3):526-39. https://doi: 10.1007/s10875-012-9854-1.
28. Lee PP, Chan KW, Chen TX i wsp. Molecular diagnosis of severe combined immunodeficiency--identification of IL2RG, JAK3, IL7R, DCLRE1C, RAG1, and RAG2 mutations in a cohort of Chinese and Southeast Asian children. *J Clin Immunol*. 2011, 31(2):281-96. https://doi: 10.1007/s10875-010-9489-z.
29. Abolhassani H,Chou J, Bainter W i wsp. (2018) Clinical, immunologic, and genetic spectrum of 696 patients with combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2018, 141(4):1450-1458. https://doi: 10.1016/j.jaci.2017.06.049.
30. Ikinciogullari A, Cagdas D, Dogu F i wsp. Turkish Pediatric Bone Marrow Transplantation Sub Group (TPBMT-SG). Clinical Features and HSCT Outcome for SCID in Turkey. *J Clin Immunol*. 2019, 39(3):316-323. https://doi: 10.1007/s10875-019-00610-x.
31. Pasic S, Vujic D, Veljkovic D, i wsp. Severe combined immunodeficiency in Serbia and montenegro between years 1986 and 2010: a single-center experience. J Clin Immunol. (2014) 34:304–8.
32. Grunebaum E, Cutz E, Roifman CM. Pulmonary alveolar proteinosis in patients with adenosine deaminase deficiency. J. Allergy Clin. Immunol. 2012;129:1588–93.
33. Verhagen M V., Trevisan V, Adu J i wsp. Chest Radiographs for Distinguishing ADA-SCID from Other Forms of SCID. J. Clin. Immunol. 2020;40:259–66.
34. Kühl JS, Schwarz K, Münch A i wsp. Hyperbilirubinemia and rapid fatal hepatic failure in severe combined immunodeficiency caused by adenosine deaminase deficiency (ADA-SCID). Klin. Padiatr. 2011;223:85–9.
35. Kohn DB, Hershfield MS, Puck JM i wsp. Consensus approach for the management of severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. J. Allergy Clin. Immunol. 2019;143:852–63.
36. Hassan A, Booth C, Brightwell A i wsp. Outcome of hematopoietic stem cell transplantation for adenosine deaminase–deficient severe combined immunodeficiency. Blood 2012;120:3615–24.

37. Cuvelier GDE, Logan BR, Prockop SE i wsp. Outcomes following treatment for ADA-deficient severe combined immunodeficiency: a report from the PIDTC. Blood. 2022 Aug 18;140(7):685-705.
38. Lankester AC, Neven B, Mahlaoui N i wsp. Hematopoietic cell transplantation in severe combined immunodeficiency: The SCETIDE 2006-2014 European cohort. J Allergy Clin Immunol. 2022 May;149(5):1744-1754.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2021.10.017.
39. Lankester AC, Albert MH, Booth C i wsp. EBMT/ESID inborn errors working party guidelines for hematopoietic stem cell transplantation for inborn errors of immunity. Bone Marrow Transplant. 2021;56:2052–62.
40. Kreins AY, Velasco HF, Cheong KN i wsp. Long-Term Immune Recovery After Hematopoietic Stem Cell Transplantation for ADA Deficiency: a Single-Center Experience. J Clin Immunol. 2022 Jan;42(1):94-107.
41. Ghimenton E, Flinn A, Lum SH i wsp. Hematopoietic Cell Transplantation for Adenosine Deaminase Severe Combined Immunodeficiency-Improved Outcomes in the Modern Era. J Clin Immunol. 2022 May;42(4):819-826.
42. Weinberg K, Hershfield MS, Bastian J i wsp. T lymphocyte ontogeny in adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency after treatment with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase. J. Clin. Invest. 1993;92:596–602
43. Stephan JL, Velekova, Le Deist F i wsp. A retrospective single-center study of clinical presentation and outcome in 117 patients with severe combined immunodeficiency. J Pediatr. 1993;123:564–72
44. Canadien Tuberculosis Standard, Ed. Public Health Agency of Canada, chapter 7. Behr M, Kevin Elwood K. BacilleCalmette – Guerin (BCG) vaccination in Canada, 2014.
45. Ying W, Sun J, Liu D i wsp. Clinical characteristics and immunogenetics of BCGosis/BCGitis in Chinese children: a 6 year follow-up study. PLoS One. 2014;9(4):e94485. 10.1371/journal.pone.0094485 eCollection 2014
46. Thon V. Necessity of postpone BCG vaccination - lesson from complications and deaths of children with primary immunodeficiencies. Studia pneumologica et phtiseologica, Praha: Trios, 2010, roč. 70, č. 1, s. 30–34
47. BCG vaccine, Biomed, Lublin, Poland; https://biomedlublin.com/pl/produkty/szczepionka-przeciwgruzlicza-bcg-100/.

48. Grzybowska K, Brzezińska S, Augustynowicz-Kopeć E i wsp PCR-based genomic deletion analysis of RD-regions in the identification of mycobacteria isolated from adverse events following BCG vaccination or TB suspected cases. Pol J Microbiol. 2014;63(3):359–362. doi: 10.33073/pjm-2014-048.
49. Krysztopa-Grzybowska K, Brzezińska S, Augustynowicz-Kopeć E i wsp. Descendant of daughter Brazilian BCG Moreau substrain in Poland. Vaccine. 2012;30:5512–5518. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.056.
50. Krysztopa-Grzybowska K, Lutyńska A. Microevolution of BCG substrains. Postepy Hig Med Dosw (Online) 2016;70(0):1259–1266.
51. Mazzucchelli JT, Bonfim C, Castro GG i wsp. Severe combined immunodeficiency in Brazil: management, prognosis, and BCG-associated complications. J Investig Allergol Clin Immunol. 2014;24(3):184–191
52. Suliman S, Geldenhuys H, Johnson JL i wsp. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) revaccination of adults with latent *Mycobacterium tuberculosis* infection induces long-lived bcg-reactive NK cell responses. J Immunol. 2016;197(4):1100–10.
53. IJspeert H, Driessen GJ, Moorhouse MJ i wsp. Similar recombination-activating gene (RAG) mutations result in similar immunobiological effects but in different clinical phenotypes. J Allergy Clin Immunol. 2014;133(4):1124–33
54. Picard C, Gaspar HB, Waleed AH i wsp. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. J Clin Immunol. 2018;38(1):96–128
55. Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F i wsp. BCG-induced trained immunity in NK cells: Role for non-specific protection to infection. Clin Immunol. 2014;155(2):213–9
56. Portevin D, Young D. Natural killer cell cytokine response to M. bovis BCG Is associated with inhibited proliferation, increased apoptosis and ultimate depletion of NKp44(+)CD56(bright) cells. PLoS One. 2013;8(7):e68864. doi: 10.1371/journal.pone.0068864.
57. García-Cuesta EM, Esteso G, Ashiru O i wsp. Characterization of a human anti-tumoral NK cell population expanded after BCG treatment of leukocytes. Oncoimmunology. 2017;6(4):e1293212. 10.1080/2162402X.2017.1293212 eCollection 2017.

58. Tirosh I, Yamazaki Y, Frugoni F i wsp. Recombination activity of human recombination-activating gene 2 (RAG2) mutations and correlation with clinical phenotype. J Allergy Clin Immunol. (2018) 143:726–35.
59. Lee YN, Frugoni F, Dobbs K i wsp. A systematic analysis of recombination activity and genotype-phenotype correlation in human recombination-activating gene 1 deficiency. J Allergy Clin Immunol. (2014) 133:1099–108
60. Walter JE, Rosen LB, Csomos K i wsp. Broad-spectrum antibodies against self-antigens and cytokines in RAG deficiency. J Clin Invest. (2015) 125:4135–48
61. Lawless D GC, Farmer JR, Lango Allen H i wsp. Prevalence and clinical challenges among adults with primary immunodeficiency and recombination-activating gene deficiency. J Allergy Clin Immunol. (2018) 141:2303–6.
62. Dalal I, Tasher D, Somech R i wsp. Novel mutations in RAG1/2 and ADA genes in israeli patients presenting with T-B-SCID or omenn syndrome. Clin Immunol. (2011) 140:284–90.
63. Sharapova SO, Guryanova IE, Pashchenko OE i wsp. Molecular characteristics, clinical and immunologic manifestations of 11 children with omenn syndrome in East slavs (Russia, Belarus, Ukraine). J Clin Immunol. (2016) 36:46–55.
64. Farmer JR, Foldvari Z, Ujhazi B i wsp. Outcomes and treatment Strategies for autoimmunity and hyperinflammation in patients with RAG deficiency. J Allergy Clin Immunol Pract. (2019) 7:1970–85
65. Strauss KA, Puffenberger EG, Bunin N i wsp. Clinical application of DNA microarrays: molecular diagnosis and HLA matching of an Amish child with severe combined immune deficiency. Clin Immunol. (2008) 128:31–8.
66. Al-Herz W, Massaad MJ, Chou J i wsp. DNA recombination defects in Kuwait: clinical, immunologic and genetic profile. Clin Immunol. (2018) 187:68–75.
67. Greenberg-Kushnir N, Lee YN, Simon AJ i wsp. A large cohort of RAG1/2-deficient SCID patients-clinical, immunological, and prognostic analysis. J Clin Immunol. (2019) 40:211–22. 10.
68. Schuetz C, Pannicke U, Jacobsen EM i wsp. Lesson from hypomorphic recombination-activating gene (RAG) mutations: why asymptomatic siblings should also be tested. J Allergy Clin Immunol. (2014) 133:1211–5.
69. Chou J, Hanna-Wakim R, Tirosh I i wsp. A novel homozygous mutation in recombination activating gene 2 in 2 relatives with different clinical phenotypes:

Omenn syndrome and hyper-IgM syndrome. J Allergy Clin Immunol. (2012) 130:1414–6.

70. Kwan A, Church JA, Cowan MJ i wsp. Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia in California: results of the first 2 years. J Allergy Clin Immunol. 2013 Jul;132(1):140-50. doi: 10.1016/j.jaci.2013.04.024. PMID: 23810098; PMCID: PMC3759317.
71. Ulusoy E, Karaca NE, Azarsiz E i wsp. Recombinase activating gene 1 deficiencies without omenn syndrome may also present with Eosinophilia and bone marrow fibrosis. J Clin Med Res. (2016) 8:379–84.
72. Abolhassani H, Chou J, Bainter W i wsp. Clinical, immunologic, and genetic spectrum of 696 patients with combined immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol. (2018) 141:1450–8.
73. Kumánovics A, Lee YN, Close DW i wsp. Estimated disease incidence of RAG1/2 mutations: A case report and querying the Exome Aggregation Consortium. J Allergy Clin Immunol. 2017 Feb;139(2):690-692.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2016.07.027. Epub 2016 Sep 5. PMID: 27609655; PMCID: PMC5303162.
74. Felgentreff K, Perez-Becker R, Speckmann C i wsp. Clinical and immunological manifestations of patients with atypical severe combined immunodeficiency. Clin Immunol. (2011) 141:73–82.
75. Wu KY, Purswani P, Ujhazi B i wsp. Arthritis in two patients with partial recombination activating gene deficiency. Front Pediatr. (2019) 7:235.
76. Delmonte OM, Schuetz C, Notarangelo LD. RAG Deficiency: Two Genes, Many Diseases. J Clin Immunol. (2018) 38:646–55.
77. Malyarchuk BA, Derenko MV. Mitochondrial DNA variability in Russians and Ukrainians: implication to the origin of the Eastern Slavs. Ann Hum Genet. (2001) 65:63–78.
78. Rebala K, Mikulich AI, Tsybovsky IS i wsp. Y-STR variation among slavs: evidence for the slavic homeland in the middle dnieper basin. J Hum Genet. (2007) 52:406–14.
79. Abraham RS, Recher M, Giliani S i wsp. Adult-onset manifestation of idiopathic T-cell lymphopenia due to a heterozygous RAG1 mutation. J Allergy Clin Immunol. (2013) 131:1421–3.
80. de Villartay JP, Lim A, Al-Mousa H i wsp. A novel immunodeficiency associated with hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection. J Clin Invest. (2005) 115:3291–9.

81. Villa A, Sobacchi C, Notarangelo LD i wsp. V(D)J recombination defects in lymphocytes due to RAG mutations: severe immunodeficiency with a spectrum of clinical presentations. Blood. (2001) 97:81–8.
82. Maas C, Luftinger R, Krois W i wsp. EBV-positive B-cell lymphoma manifestation of the liver in an infant with RAG1 severe combined immunodeficiency disease. Pediatr Blood Cancer. (2018) 65:e27258.
83. Howes TRL, Tomkinson AE. DNA ligase I. The replicative DNA ligase. In: Subcellular biochemistry, Subcellular Biochemistry: Springer, Dordrecht; (2012) 62:327–41.
84. Pascal JM, O'Brien PJ, Tomkinson AE, Ellenberger T. Human DNA ligase I completely encircles and partially unwinds nicked DNA. Nature (2004) 432(7016):473–8.
85. Jurkiw TJ, Tumbale PP, Schellenberg MJ i wsp. LIG1 syndrome mutations remodel a cooperative network of ligand binding interactions to compromise ligation efficiency. Nucleic Acids Res (2021) 49(3):1619–30
86. Tang Q, Kamble P, Çağlayan M. DNA Ligase I variants fail in the ligation of mutagenic repair intermediates with mismatches and oxidative DNA damage. Mutagenesis (2020) 35(5):391–404
87. Tomkinson AE, Vijayakumar S, Pascal JM, Ellenberger T. DNA Ligases: Structure, reaction mechanism, and function. Chem Rev (2006) 106(2):687–99
88. Silva JMF, Jones A, Sibson K i wsp. Haematopoietic stem cell transplantation for DNA ligase 1 deficiency. J Clin Immunol (2021) 41(1):238–42.
89. ESID Registry. Working definitions for clinical diagnosis of PID. European Society for Immunodeficiencies Registry Working Party Diagnosis criteria (2018). Available at: https://esid.org/Working-Parties/Registry-Working-Party/Diagnosis-criteria (dostęp 14.04.2025).
90. Ussowicz M, Wawrzyniak-Dzierżek E, Mielcarek-Siedziuk M i wsp. Allogeneic stem cell transplantation after fanconi anemia conditioning in children with ataxia-telangiectasia results in stable T cell engraftment and lack of infections despite mixed chimerism. Biol Blood Marrow Transplant. (2018) 24(11):2245–9.
91. Wolska-Kusnierz B, Pastorczak A, Fendler W i wsp. Hematopoietic stem cell transplantation positively affects the natural history of cancer in nijmegen breakage syndrome. Clin Cancer Res (2021) 27(2):575–84.

92. De Córdoba S.R., de Jorge E.G. Translational mini-review series on complement factor H: Genetics and disease of human complement factor H. Clin. Exp. Immunol. 2008;151:1–13.
93. Fremeaux-Bacchi V., Kemp E.J., Goodship J.A i wsp. The development of atypical haemolytic-uraemic syndrome is influenced by susceptibility factors in factor H and membrane cofactor protein: Evidence from two independent cohorts. J. Med. Genet. 2005;42:852–856.
94. Caprioli J., Bettinaglio P., Zipfel P.F i wsp. The molecular basis of familial hemolytic uremic syndrome: Mutation analysis of factor H gene reveals a hot spot in short consensus repeat 20. J. Am. Soc. Nephrol. 2001;12:297–307.
95. Chen S., Li M., Xin W i wsp. Intracranial aneurysm's association with genetic variants, transcription abnormality, and methylation changes in ADAMTS genes. Peer J. 2020;8:e8596
96. Fakhouri F., Zuber J., Frémeaux-Bacchi V., Loirat C. Haemolytic uraemic syndrome. Lancet. 2017;390:681–696
97. Nowicki M., Dębska-Ślizień A., Durlik M i wsp. The management of atypical hemolytic-uremic syndrome–the statement of the Working Group of the Polish Society of Nephrology. Nefrol. Dial. Pol. 2019;23:55–68.
98. Lemaire M., Frémeaux-Bacchi V., Schaefer F i wsp. Recessive mutations in DGKE cause atypical hemolytic-uremic syndrome. Nat. Genet. 2013;45:531–536
99. Ozaltin F., Li B., Rauhauser A i wsp. DGKE variants cause a glomerular microangiopathy that mimics membranoproliferative GN. J. Am. Soc. Nephrol. 2013;24:377–384.
100. Kind T., Levy J., Lee M i wsp. Cobalamin C disease presenting as hemolytic-uremic syndrome in the neonatal period. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 2002;24:327–329
101. Bitzan M. Glomerular Diseases. In: Phadke K.D., Goodyer P., Bitzan M., editors. Manual of Pediatric Nephrology. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany: 2014. pp. 215–225.
102. Kokame K., Matsumoto M., Soejima K i wsp. Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002;99:11902–119077
103. Żurowska A., Szczepańska M., Dębska-Ślizień A i wsp. Management of patients with suspected thrombotic microangiopathy. Position of the Coordinating

Group for the Treatment of Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome. Forum. Nefrol. 2019;12:187–201.

104. Al-Herz W., Bousfiha A., Casanova J i wsp. Primary immunodeficiency diseases: An update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. Front. Immunol. 2011;2:1–26.

105. Conway E.J., Cooke R. The deaminases of adenosine and adenylic acid in blood and tissues. Biochem. J. 1939;33:479–492.

106. Cristalli G., Costanzi S., Lambertucci C i wsp. Adenosine deaminase: Functional implications and different classes of inhibitors. Med. Res. Rev. 2001;21:105–128.

107. Blackburn M.R., Thompson L.F. Adenosine Deaminase Deficiency: Unanticipated Benefits from the Study of a Rare Immunodeficiency. J. Immunol. 2013;188:933–935.

108. Blackburn M.R., Kellems R.E. Adenosine deaminase deficiency: Metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. Adv. Immunol. 2005;86:1–41.

109. Nikolajeva O., Worth A., Hague R i wsp. Adenosine Deaminase Deficient Severe Combined Immunodeficiency Presenting as Atypical Haemolytic Uraemic Syndrome. J. Clin. Immunol. 2015;35:366–372

110. Pham-Huy A., Kim V., Nizalik E i wsp. Atypical hemolytic-uremic syndrome in a patient with adenosine deaminase deficiency. LymphoSign J. 2015;2:195–199.

111. Churchill P.C., Bidani A.K. Hypothesis: Adenosine mediates hemodynamic changes in renal failure. Med. Hypotheses. 1982;8:275–285

112. Fredholm B.B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. Cell Death Differ. 2007;14:1315–1323

113. Ratech H., Greco M.A., Gallo G i wsp. Pathologic findings in adenosine-deaminase-deficient severe combined immunodeficiency. I. kidney, adrenal, and chondro-osseous tissue alterations. Am. J. Pathol. 1985;120:157–169.

114. Hirt-Minkowski P., Dickenmann M., Schifferli J.A. Atypical hemolytic uremic syndrome: Update on the complement system and what is new. Nephron. Clin. Pract. 2010;114:219–235.

115. Bu F., Borsa N., Gianluigi A., Smith R.J. Familial atypical hemolytic uremic syndrome: A review of its genetic and clinical aspects. Clin. Dev. Immunol. 2012;2012:370426.

116. Ansari R., Rosen L.B., Lisco A i wsp. Primary and Acquired Immunodeficiencies Associated with Severe Varicella-Zoster Infections. Clin. Infect. Dis. 2020:ciaa1274.