

İmmün Yetmezliklerde Yapılacak Testler

Laboratory Assessment of Immunodeficiencies

Ümit ÖLMEZ^a

^aİmmünoloji Allerji Hastalıkları BD,
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Ankara

Yazışma Adresi/Correspondence:
Ümit ÖLMEZ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
İmmünoloji ve Allerji Hastalıkları BD,
Ankara, TÜRKİYE
uolmez@medicine.ankara.edu.tr

ÖZET Her yaşta hastalarda immün sistemin laboratuvar değerlendirmesi genel testlerle başlar. Tarama testleri; tam kan sayımı, lökosit formülü, biyokimyasal testler, tam idrar tetkiki, özel organ tutulumuna tanı koymak için testler (ör: AC radyografisi) ve inflamasyon belirteçleri (ESR, CRP) dir. Humoral immünite defektlerinde, öncelikle IgG, IgA, ve IgM miktarları ölçülmelidir. Serum protein elektroforezi, IgG altgrupları ve IgE tayini de faydalı olabilir. Sonra aşılamalara veya doğal enfeksiyona spesifik antikor cevabı (IgG) ölçülür. Hücresel immünite (T hücre) defektleri, sıklıkla antikor defektleriyle birlikte sonuçta kombine immün yetmezlik (İY) gelişir. Lenfopeni, yeni doğanlarda ağır kombine İY (SCID)'in ve daha büyük çocuklarda ve erişkinlerde ender olarak kombine İY'in erken bulgusudur. Bu durumda flow sitometri ile eksikliği tespit etmek için, lenfosit alt gruplarına bakılmalıdır. Gecikmiş tip deri aşırı duyarlılığı (DTH), hücresel immüniteyi değerlendiren hassas bir testtir. Diğer T hücre fonksiyonunu ölçen testler; T hücre fonksiyonunu gösteren in vitro çalışmalar, sitokin salımı ve sitotoksik testler ve genetik analizlerdir. Primer fagositik hücre defektlerinde; tam kan sayımı, formül lökosit, kompleman eksikliklerinde total hemolitik kompleman (CH50) tarama testidir.

Anahtar Kelimeler: İmmünite; primer immün yetmezlik ; immünolojik tanı; laboratuvar tanısı

ABSTRACT In patients of any age, the laboratory evaluation of the immune system begins with general studies. Screening laboratories include complete blood count with differential, chemistry panels, urinalysis, test to diagnose specific organ involvement (eg: chest radiograph), and inflammation markers (CRP or ESR). Defects in humoral immunity, IgG, IgA, and IgM should be measured initially, Serum protein electrophoresis, IgG subgroups and IgE evaluation may be useful. The next step in measurement of serum specific antibody titers (IgG) in response to intentional immunization (vaccine response) or natural infection. Defects in cellular immune function (T cell disorders) are often accompanied by antibody defects, yielding combined immunodeficiencies. Lymphopenia is an early indicator of severe combined immunodeficiency (SCID) in infants and of combined immunodeficiencies in older children and occasionally adults. This should be followed by flow cytometry to determine which lymphocyte subsets are deficient. Cutaneous delayed-type hypersensitivity (DTH) testing is a sensitive indicator of intact cellular immunity. In vitro studies of T cell function, cytokine release assays, cytotoxic assays and genetic analysis are other T cell tests. The complete blood count with differential for primary phagocytic cell deficiencies; total hemolytic complement (CH50) for complement defects are initial screening tests.

Key Words: Immunity; primary immunodeficiency; immunologic diagnosis; laboratory assessment

Türkiye Klinikleri J Immun Allergy-Special Topics 2016;9(2):50-5

İmmün yetmezlik (İY) hastalıkları, tekrarlayan enfeksiyonlarda öncelikle akla gelmelidir. İmmün disregülasyon'da tekrarlayan enfeksiyonlarla beraber, otoimmün hastalıklar, inflamatuvar hastalıklar, maligniteler, allerjik hastalıkların da görülebileceğini hatırlamak gerekir.¹

İmmünolojik testleri yapmadan önce, klinisyen hastadan detaylı bir hikaye almalı ve tam bir fizik muayene yapmalıdır. İmmün yetmezlik hastalıkları çok sayıda ve değişik yaşlarda görülebildiği için, İY şüphelenildiği zaman, geçirilen enfeksiyonların tipleri; sıklık, kronisite, şiddet, tedaviye cevap, mikroorganizmanın cinsi araştırılmalıdır. Hastalığın başlangıç yaşı, hastanın cinsiyeti, sistem sorgusunda birlikte bulunan immün sistem dışındaki semptomlar ve bulgular sorgulanmalıdır.

Başlangıç tarama laboratuvar testleri: Öncelikle, non-immün, sekonder, primer İY hastalıkları arasında ayırım yapmak gerekir. Her yaştaki hastalarda immün sistemin laboratuvar değerlendirmesi genel testlerle başlar;

■ **Tam kan sayımı, lökosit formülü: Lenfopeni,** birçok kombine hücrel ve antikor eksikliği durumlarında karakteristik bulgudur. Lenfopeni, erişkinlerde mutlak lenfosit sayısı <1500 hücre/mikrolitre (μl) [mm^3], yenidoğanda, <2500 hücre/mikrolitre (μl) [mm^3] olarak tanımlanır. **Nötropeni,** primer fagosit hastalıklarında, sekonder İY lerde görülür. Bütün nötropeni durumlarında, gizli malignite veya miyelodisplaziye atlamamak için kemik iliği aspirasyonu yapılmalıdır. **Lökositoz** bazen görülebilir, kronik enfeksiyonu düşündürür.¹

■ **Biyokimyasal testler:** Sekonder İY'e sebep olacak metabolik hastalıklara (diabetes mellitus, karaciğer, böbrek hastalığı) tanı koymak için gereklidir. Hipoalbuminemi, malnütrisyon veya protein kaybını gösterir. Yükselmiş globülin seviyeleri, gamopatilerde veya kronik enfeksiyonlarda görülür.^{1,2}

■ **İdrar analizi:** Proteinüri, silindirler ve hücreler nefriti düşündürür.

■ **Spesifik enfeksiyonları değerlendirmek için testler:** Uygun kültürler, tekrarlayan sinopulmoner enfeksiyonlarda gerektiğinde sinüs radyografisi, gizli bronşektazi, hiler lenfadenopati ve granülomların varlığında yüksek rezolüsyonlu akciğer tomografisi gerekebilir. Sonuçlar, diğer laboratuvar ve klinik bulgular eşliğinde yorumlanmalıdır. Örneğin, AC, KC veya dalakta granülomlar kronik granülomatöz hastalık, CVID veya sarkoidoz da görülebilir.

Çocuklar ve nadiren erişkinlerde nazal polipozis mevcudiyetinde, sık sinopulmoner enfeksiyonların sebebi olan kistik fibrozis araştırılmalıdır. Çocuklarda AC grafilerinde timus gölgesinin olmaması ağır İY'i düşündürür. Büyük çocuklarda ve erişkinlerde AC grafilerinde eski enfeksiyonların izleri, interstisyel AC hastalığı veya bronşektazi görülebilir. AC de havalanma artışı, kronik obstrüktif Ac has (KOA), veya kronik astımı düşündürür.

■ **İnflamasyon belirteçleri:** Eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), C-reaktif protein (CRP): Akut faz reaktanlarındaki nonspesifik yükselmeler, enfeksiyöz veya inflamatuvar hastalıklarda görülebilir. İleri incelemeler yapılmalıdır.¹

İleri immünolojik testler, her yerde yapılamayan, pahalı testlerdir. Mümkün olduğu kadar hastalığın başında, basitten başlayarak yapılmalı ve immünolojist/allerjist'e sevk edilmelidir. Kesin tanı konulması için, flow sitometri veya moleküler metodların kullanıldığı referans laboratuvarları gerekebilir.

İmmün yetmezliklerin sınıflandırılması ve spesifik komponentlerin testleri:³⁻⁵

İmmün yetmezlik hastalıkları içinde antikor (ak) eksiklikleri ve defektleri; %65, kombine ak ve hücrel İYler ; %15, fagosit defektleri; %10, izole hücrel defektler; %5, kompleman sistemi hastalıkları; %5, doğal immünitinin diğer hastalıkları <%1'ini yapar.¹

ANTİKOR EKSİKLİKLERİ VE DEFETLERİ

Antikor seviyelerinin ölçümü: İmmünglobülin G (IgG), IgA ve IgM'nin ölçümü gereklidir.

Hipogammaglobülinemi; IgG'nin normalden iki standart deviasyon az olması, agammaglobülinemi ise IgG'nin <100 mg/dL olması olarak tanımlanır.

Bütün Ig'lerin az olmasına ağır kombine İY'lerde rastlanır. Diğer kombine İY'ler, ve humoral İY'lerde eksik olan Ig izotipi tanıya yardımcı olur. IgG altgrupları ve IgE tayini de faydalı olabilir. Hastada tekrarlayan bakteriyel enfeksiyon ve dermatit varlığında çok yüksek IgE seviyesi (ör: >2000 IU/mL) saptanması, "hiper IgE sendromu" nu düşündürür.^{1,3}

Serum protein elektroforezi: Gamma globülin eğrisinde azalma, hipogammaglobülinemi ak ek-sikliğini gösterir.

Antikor fonksiyonu ölçümü: Aşılama veya doğal enfeksiyon sonrası spesifik organizmalara cevap olarak yapılan antikor titrelerinin ölçümü ile ak fonksiyonu ölçülür.

Antikor fonksiyonu, humoral immüniteyi de-ğerlendirmede iki sebepten önemlidir:

1. Serum ak seviyeleri normal olmasına rağmen ak fonksiyonu bozuk olabilir.

2. Subnormal total IgG veya IgG subgrup ek-sikliklerinde aşılama normal ak cevabı görülebi-lir. Bu durum hipogammaglobülineminin sekonder sebeplerinde (ör: ilaçlar, protein kaybı, veya mal-nütrisyon) görülür.

Ak cevabı iki tip antijenlerle tespit edilir; pro-tein ve polisakkarid antijenler.

■ Difteri, tetanus, Hemofilus influenza B ve protein konjugatlı pnömokok aşılıları gibi protein antijenlere cevabı ölçmede kullanılır.

■ Pnömonokların birçok serotiplerinin aşılıları, polisakkarid antijenlerine cevabı ölçer. Bu de-ğerlendirme, iki yaşından büyük çocuklarda faydalıdır.

■ İzohemaglutininler, barsak florasındaki po-lisakkaridlere karşı gelişen ve A ve B grubu eritro-sit antijenleri ile kros reaksiyon veren antikorlardır. Altı aydan sonra kanda ortaya çıkan AB grubu dışındaki kan gruplarında bulunan anti-korlardır. Bununla beraber aşılamalara antikor ce-vabı, sağlam humoral immün sistem fonksiyonunu gösteren güvenilir bir göstergedir.

İmmünglobülin kaybını ölçme: Düşük sevi-yede immünglobülinler, GI yol, idrar, AC, deri, plevral boşluk veya dializ sırasında peritoneal sı-vıya protein kaçağı olması sonrası gelişir. Bazı se-konder İY lerde görülür.¹

HÜCRESEL İMMÜN YETMEZLİK

Hücresel immünite (Hİ); T hücre aracılıklıdır ve T hücrelerini etkileyen defektler en ağır immün yet-mezlilere sebep olur. Bununla birlikte B hücrele-

rinin antikor yapabilmesi için sağlam T hücre yar-dımı gerektiğinden, birçok T hücre defektleri kom-bine (hücrel ve humoral) immün yetmezliğe yol açar.

Ağır viral ve/veya bakteriyel hastalıklar veya fırsatçı enfeksiyon geçiren hastalarda hücrel im-münite değerlendirilmelidir. Bu hastalıklarda hü-cresel immünite çeşitli yaşlarda farklı etkilenir. Bir yaşın altında, primer İY'in en sık sebebi hücrel immün yetmezliktir. Daha büyük çocuklarda ve erişkinlerde ana sebepler, sekonder sebeplerdir (HIV inf, iyatrojenik immün supresyon). Nadiren primer kombine İY veya DiGeorge sendromuna erişkin yaşa kadar tamı konamayabilir.¹

Tam kan sayımı, lökosit formülü ve periferik yayma hücrel immün sistem hakkında değerli bilgiler verir. Lenfopeni ve kabaca birlikte bulu-nan hematolojik bulgular hakkında fikir verir. Tek bulgu olarak lenfopeni varlığı birçok enfeksiyon hastalıklarında görülebilir.^{1,3,6} Derin lenfopeni hücrel immün yetmezliğin veya önemli bir has-talığın ilk bulgusu olabilir (ör: lenfoma). Lenfopeni birçok hastalıkta görülebilir (Tablo 1). Bazen len-fosit sayısı normal olabilir, klinik İY'e uyuyorsa flow sitometri ile lenfosit subgruplarına bakılabil-ir.¹

Lenfopeni; erişkinlerde total lenfosit sayısı <1500 hücre/mikrolitre (μ l) [mm^3], yenidoğanda <2500 hücre/mikrolitre (μ l) [mm^3] olarak tanımla-nır.

Gecikmiş tip deri aşırı duyarlılığı (DTH) (Can-dida, trichopyton, mumps): Gecikmiş tip deri aşırı duyarlılığı, hücrel immüniteyi değerlendiren kla-sik bir testtir. Bu test, bireyin uzun süre maruz kal-dığı antijenin intra dermal verilmesiyle hatırladığı bir cevabı ölçer.^{1,3}

İntrakütan antijen enjeksiyonuna pozitif cevap; antijen sunan hücreler tarafından antijenin alınması ve işlenmesi, CD4 + helper hücrelerle et-kileşmesi, T hücrelerinden sitokin salınımı, ve so-nuçta monosit ve makrofajların aktivasyonu ve olay yerine gitmesini içerir. Bu nedenle deri testi, sağlam hücrel immünitenin hassas bir gösterge-sidir, fakat negatif sonuçlar dikkatle yorumlanma-lıdır.

Enfeksiyon	Sistemik hastalık	Diğer
Bakteriyel (ör: tüberküloz, tifo, bruselloz)	Otoimmün hastalıklar (ör: SLE, RA, Sjögren sendromu)	Konjenital immün yetmezlik hastalıkları
Viral (ör: HIV, SARS (ağır akut respiratuvar sendrom), kızamık, hepatit]	Lenfoma, Diğer maligniteler	İyatrojenik: İmmünosupresif ilaçlar (ör: KS, ritüksimab, fludarabin), kemik iliği transplantasyonu, radyasyon tedavisi
Mantar (ör: histoplazmozis)	Sarkoidoz	Alkol bağımlılığı
Parazit (ör: malarya)	Böbrek yetmezliği Aplastik anemi, pansitopeni Cushing sendromu	Çinko eksikliği Malnütrisyon, stres, egzersiz, travma Protein kaybettiren enteropatiler İdiyopatik CD4+ lenfopeni

Viral ve bakteriyel enfeksiyon (Ör: canlı atennüe kızamık, kızamıkçık, kabakulak aşısı), antiinflamatuvar ilaçlar (KS'ler) ve diğer immünosupresifler (siklosporin, takrolimus, mikofenolik asit) DTH deri reaksiyonunu baskılar.

DTH'yi değerlendirmede PPD yanıtının olup olmaması önem arzeder.

DTH testinin esas avantajı kolay ve ekonomik olmasıdır. Hücresel immün yetmezlik şüphelenildiği durumlarda tarama testi olarak kullanılır. Negatif sonuçlar takip edilmeli veya flow sitometri ile lenfositleri sayma, in vitro T hücre fonksiyon testleri yapılmalıdır.

Flow sitometri: Flow sitometri ile monoklonal antikorlar kullanılarak, spesifik antijenleri (cluster designations: CD) olan hematopoetik hücrelerin sayısı ölçülür. Tablo 2'de lenfosit popülasyonları ve onları gösteren temel işaretler gösterilmiştir.¹

Flow sitometrik analizle eş zamanlı olarak tam kan sayımı, formül lökosit yapılmalıdır. Bu analiz

her lenfosit alt grubunun mutlak sayılarını ölçme imkanını verir.^{1,2} Standart flow sitometri analizi, ağır kombine immün yetmezlik (SCID) ve birçok kombine immün yetmezliklerde anormal sonuç verir (Tablo 3). Ağır immün yetmezlik kliniği olan hastalarda, lenfosit sayıları normal olabilir veya tersine total lenfosit sayıları ve lenfosit alt grupları bazı enfeksiyonlar ve başka faktörlerle değişmiş olabilir.^{6,7} Bu nedenle flow sitometri sonuçları, immün sistemin diğer fonksiyon testleriyle birlikte değerlendirilmelidir.

İLERİ TESTLER

Spesifik hücresel immün yetmezlikler için birçok gelişmiş testler immünoloji uzmanı denetiminde yapılmalıdır.

- İleri flow sitometri: Aktive hücreler, regülatör hücreler, naive veya memory hücreler, B hücrelerinin değişik gelişme safhasının ölçülmesi

- TRECs (T cell receptor excision circles) analizi

Lenfositin İşareti	Hücre tipi	Hücelere dağılımı
CD3	T hücreler	Bütün T hücrelerin üstünde ekspres edilir
CD4	T cell subgrubu	Genel olarak helper/inducer T hücreler
CD8	T cell subgrubu	Genel olarak sitotoksik T hücreler; NK hücrelerin 1/3'ünde ekspres edilir
CD19 veya CD20	B hücreler	
CD16	NK hücreler	Bazı NK hücreler CD16 ekspres etmeyebilir
CD56	NK hücreler	NK hücrelerinin çoğunda ekspres edilir
CD57	NK hücreler	NK hücrelerinin çoğunda ekspres edilir ; CD16, CD56, ve CD57 kombinasyonları tek işaretten daha güvenilirdir
CD45RA	Naive T hücreleri	
CD45RO	Hafıza (memory) T hücreler	

NK: Natural killer (doğal öldürücü).

TABLO 3: Bazı immün yetmezlik hastalıklarında çeşitli lenfosit popülasyonlarındaki değişiklikler.

Hastalık	CD3	CD4	CD8	CD19/20	CD16/56/57
X'e bağlı SCID (Ağır kombine immün yetmezlik)	↓↓	↓↓	↓↓	N, ↑	↓
SCID (rekombinasyon defektine bağlı)	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	N, ↑*
ADA eksikliği	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
PNP eksikliği	↓	↓ p	↓ p	N	N, ↑*
MHC class II eksikliği	↓	↓↓	↓↓	N	N
CD3 eksikliği	↓↓	↓↓	↓↓	N	N
XLA (X'e bağlı agammaglobulinemi)	N	N	N	↓↓	N
WAS (Wiskott-Aldrich syndrome)	↓	↓ p	↓ p	N	N
AT (ataksi-telenjektazi)	↓	↓	↓	↓	N
DiGeorge anomalisi	N, ↓	N, ↓	N, ↓	N	N
CVID (Common variable immün yetmezlik)	N, ↓	N, ↓	N, ↓	N, ↓	N

ADA eksikliği: adenosin deaminaz eksikliği; PNP eksikliği: pürin nukleozid fosforilaz eksikliği; MHC: major histokompatibilite kompleksi; CD3 eksikliği:CD3 komponenti(gamma, epsilon) eksikliği; N: normal; p: azalma zamanla artar.

* Hastalıkta esas eksik olan hücre alt grubuna bağlı olarak NK hücrelerinin yüzdesi artabilir. Mutlak NK hücre sayısı genellikle normaldir.

■ Sitotoksikite testleri

■ Sitokin ölçümü: Hücrelerde, serumda veya doku kesitlerinde

■ Genlerde mutasyon analizi

■ Kromozom analizi

■ CD3/T hücre reseptör analizi ve fonksiyonu

İn vitro T hücre fonksiyonu: T hücre fonksiyonunu ölçen in vitro çalışmalar, bazı farklı uyarılara karşı, perifer kandaki T lenfositlerin proliferasyonunu ölçer.

■ Mitojenler (fitohemaglutinin, concanavalin-A, pokeweed mitojen),

■ Spesifik antijenler (tetanus ve difteri toksoidleri ve kandida antijenleri),

■ Allojeneik lenfositler (mikst lenfosit kültürü)

Bu çalışmaların, periferik kan lenfosit subpopülasyonlarının flow sitometrik ölçümleri ile birlikte yapılması gerekir.

FAGOSİTİK HÜCRE DEFİKTLERİ

Fagositik hastalıklar ekstresek veya intrinsek defektlere bağlıdır. Ekstresek bozukluklar, ak ve kompleman eksikliklerine sekonder opsonik anormallikler, granülosit üretiminde azalma ve lökosit otoantikörleri veya dolaşan nötrofil sayısını azaltan izoantikörler nedeniyle meydana gelir. Nötro-

fillerin intrinsek bozuklukları; granülosit öldürme kabiliyetinde veya kemotaksi (hücre hareketi) de bozulma sonucu ortaya çıkar.

Nötrofil sayılarını değerlendirme: Tam kan sayımı, formül lökosit

Lökositoz: Adezyon defekti (kemotaksi). Ağır nötropeni: Konjenital agranülositoz veya siklik nötropenide görülür. Nötrofil sayıları normale, nötrofil fonksiyonuna bakılmalıdır. Nötrofil fonksiyon boz.ları; Kr.Granüloamatöz hastalık (CGD), Chediak-Higashi sendromu (CHS), nötrofil-spesifik granül defekti, lökosit adezyon defekti ve hiper IgE sendromunda görülür.

Dihidrorodamin (DHR) test: 'Nötrofil oksidatif burst' kantitatif, heterozigot Kr.Granüloamatöz hastalık (CGD) taşıyıcılarını gösteren flow sitometrik testtir nitroblue terazolium testi (NBT)nin yerini almıştır. NBT testi de tarama amaçlı kullanılmaktadır.

IgE seviyesindeki yükselme, hiper IgE sendromunda görülür.

Periferik yayma: Nötrofil, eozinofillerde dev azurofilik granüller CHS'da görülür. Nötrofil granüllerinde eksiklik, nötrofil-spesifik granül eksikliğinde görülür.

Mutasyon analizi, adherens, kemotaksi, mikrobisidal aktivite testleri de yapılabilir.

KOMPLEMAN EKSİKLİKLERİ

Konjenital veya akkiz olabilir.

Klasik yol tarama testleri: Total hemolitik kompleman assay (CH50), C3 ve C4 seviyesi

Alternatif yol eksikliği: AH50 (tarama testi), properdin, faktör D eksikliği

C1esteraz inhibitör eksikliklerinde' hereditör anjiödem 'gelişir.

DOĞAL İMMÜN SİSTEM DEFEKTLERİ

NK eksikleri: Tekrarlayan herpes virüs enfeksiyonlarında, natural killer: NK hücre sayısı azalmış olabilir (≤ 100 hücre/ μ l). NK hücreleri için ileri tetkikler yapılmalıdır.

IL-12/IFN γ yolundaki defektler: IFN γ reseptör 1 (IFNGR1) gen, IFN- γ reseptör 2 (IFNGR2) gen, IL-12 reseptör beta 1 gen (IL12RB1) ve IL-12B gen ve STAT 1 geninde defektler olabilir.¹

KAYNAKLAR

- Bonilla FA, Stiehm ER, Wood RA, Feldweg AM. In: Post TW, ed. Laboratory evaluation of the immune system. UpToDate, Waltham, MA; 2016.
- Chinratanapit S, Sriaroon P, Sleasman JW. Diagnostic Approach to the Adult with Suspected Immune Deficiency. World Allergy Organization, Updated: June 2015.
- Holland SM, Bellanti JA. Immune Deficiency Disorders. In: Bellanti JA, ed. Immunology IV, Clinical Applications in Health and Disease, Maryland: I Care Press; 2012. p.559-639.
- Abbas A, Lichtman AH, Pillai S. Congenital and Acquired immunodeficiency. Cellular and Molecular Immunology. 6th ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier; 2010. p.463-88.
- Chinen J, Paul ME, Shearer WT. Approach to the evaluation of the immunodeficient patients In: Rich RR, ed. Clinical Immunology. 4th ed. Philadelphia : Elsevier Saunders; 2013. p.381-48.
- Laurence J. T-cell subsets in health, infectious disease, and idiopathic CD4+ T lymphocytopenia. Ann Intern Med 1993;119(1):55-62.
- Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, Oymopito R, Plaeger S, Stiehm ER, et al; Pediatric AIDS Clinical Trials Group. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. J Allergy Clin Immunol 2003;112(5):973-80.