

Praca oryginalna

Original paper

Diagnostyka chorób z autoagresji w Zakładzie Prewencji i Immunologii Weterynaryjnej AR we Wrocławiu w latach 1993-2005

TADEUSZ STEFANIAK, JANINA ŁUKASZEWSKA, MARIA NIEMCZUK*,
ANNA NOWOROLSKA**, JAROSŁAW POPIEL***, STANISŁAW DZIMIRA,
JÓZEF GALLI, ADAM JANKOWSKI*, PAULINA JAWOR, WOJCIECH NOWACKI

Zakład Prewencji i Immunologii Weterynaryjnej + Katedra Fizjologii + Katedra Anatomii Patologicznej, Patofizjologii,
Mikrobiologii i Weterynarii Sądowej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

*Katedra Propedeutyki Pediatrii i Klinika Immunologii i Reumatologii Wieku Rozwojowego AM,
al. J. Kasprowicza 64/66, 50-137 Wrocław

**Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii AM, ul. Chałubińskiego 1, 50-368 Wrocław

***Katedra Chorób Wewnętrznych i Pasożytniczych z Kliniką Psów, Kotów i Koni UP, pl. Grunwaldzki 47, 50-366 Wrocław

Stefaniak T., Łukaszewska J., Niemczuk M., Noworolska A., Popiel J., Dzimira S.,
Galli J., Jankowski A., Jawor P., Nowacki W.

Autoaggression diseases' diagnostics at Department of Veterinary Prevention and Immunology Agricultural University of Wrocław in years 1993-2005

Summary

During the years 1993-2005 232 dogs suspected of autoimmune mediated diseases (18 cases in years 1993-2001; 17 in 2002; 48 in 2003; 90 in 2004 and 59 in 2005) were examined. Detection of anti-erythrocyte antibodies was performed on 213 vein blood samples using Coombs test. Antinuclear antibodies (ANA) were estimated in 124 and circulating immune complexes (CIC) in 96 serum samples. In 13 cases immuno-histochemical examination of skin or inner organ sections was done. The described methods were utilized in the diagnosis and treatment monitoring of immune mediated hemolytic anemia (IMHA) and systemic lupus erythematosus (SLE) cases. The frequency of positive results was estimated in clinically defined cases. Over 71% SLE or SLE-suspected patients presented positive ANA results, and all of them had elevated concentrations of CIC. In cases of IMHA/suspected IMHA, about 78% showed positive Coombs test while IgG class titers mostly exceeded 1:640.

Keywords: IMHA, SLE, immunochemistry

Choroby z autoagresji stanowią stosunkowo niewielki odsetek przypadków patologii występujących u psów, jednak cechują się długotrwałym przebiegiem i często niepomyślnym rokowaniem (5, 9, 19). Jedną z przyczyn są ciągle niedostateczne możliwości precyzyjnego diagnozowania choroby, a co za tym idzie – wdrożenia prawidłowego leczenia i jego monitorowania. Wykorzystanie niektórych testów laboratoryjnych, takich jak: oznaczanie przeciwciał antyjądrowych (6, 14, 17), przeciwciał antyerytrocytarnych (1-3, 12-15, 20) czy badanie histopatologiczne i immunofluorescencyjne wycinków skóry i narządów wewnętrznych (13, 18) zwiększa prawdopodobieństwo postawienia właściwej diagnozy i ułatwia ocenę poprawności przebiegu leczenia.

Diagnostyka chorób z autoagresji występujących u psów została podjęta w Zakładzie Prewencji i Immunologii Weterynaryjnej w odpowiedzi na pytania

i wątpliwości klinicystów, poszukujących potwierdzenia diagnozy klinicznej i doboru właściwego sposobu leczenia pacjentów. Główną grupę pacjentów stanowiły psy podejrzane o anemię hemolityczną o podłożu immunologicznym (IMHA, Immune Mediated Haemolytic Anemia). Drugą znaczącą grupę reprezentowały psy wykazujące zmiany skórne – z których główne grupy stanowiły psy z długo trwającymi dermatozami ze wskazaniem na alergiczne podłoże schorzeń, lub podejrzane o choroby pęcherzowe. Kolejną grupę stanowiły psy wykazujące objawy główne i dodatkowe tocznia układowego (SLE – Systemic Lupus Erythematosus). Pozostałe psy wykazywały zmiany narządowe, szczególnie niewydolność nerek, choroby gałki ocznej, zapalenia wielostawowe i inne.

Od 1993 r. podjęto wykrywanie przeciwciał antyerytrocytarnych testem Coombsa w klasie IgG, a także skórne testy alergologiczne. Diagnostyka krążących

kompleksów immunologicznych (CIC, Circulating Immune Complexes) była sporadycznie prowadzona od połowy lat 80. Od marca 2003 r. w teście Coombsa wykrywano przeciwciała klasy IgG i składnik C3 dopełniacza, a od października 2004 r. przeciwciała klasy IgG i IgM oraz składnik C3 dopełniacza jednocześnie. Od listopada 2002 roku oznaczano obecność przeciwciał antyjądrowych (ANA – Antinuclear Antibodies) w surowicy. W tym samym czasie rozpoczęto identyfikację zmian w wycinkach skóry i narządów wewnętrznych psów metodą immunofluorescencji.

Celem niniejszego opracowania było podsumowanie wyników kilku testów diagnostycznych wykonywanych w Zakładzie Prewencji i Immunologii Weterynaryjnej w latach 1993-2005 w przypadkach podejrzenia chorób z autoagresji.

Materiał i metody

Materiał stanowiły próbki krwi pacjentów z podejrzeniem chorób z autoagresji, pochodzących z klinik Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, a także prywatnych lecznic z Wrocławia i południowo-zachodniej Polski. Przebadano 232 psy (z tego w latach 1993-2001 18 osobników; w roku 2002 – 17; 2003 – 48; 2004 – 90; 2005 – 59). W kierunku obecności przeciwciał antyerytrocytarnych zbadano 213 próbek krwi żyłnej pobranej na antykoagulant. W surowicy przeprowadzono badania na obecność przeciwciał antyjądrowych u 124 psów, a u 96 oznaczono obecność CIC.

W celu wykrycia przeciwciał autoreaktywnych wykonano też badanie 12 skrawków skóry pobranej z granicy zmian patologicznych podejrzewanych o choroby pęcherzowe i 1 wycinka nerki od psa z niewydolnością nerek w przebiegu zdiagnozowanego klinicznie i potwierdzonego obecnością przeciwciał antyjądrowych tocznia rumieniowatego.

Badania na obecność przeciwciał antyerytrocytarnych. Przeciwciała antyerytrocytarne związane z krwinkami pacjentów wykrywano testem Coombsa (procedurę wzorowano na stosowanej w Arbeitsgruppe Immunologie, Tierärztliche Hochschule Hannover, Niemcy). Próbkę krwi pobranej na EDTA rozdzielano na dwie części. Jedną inkubowano w 37°C, drugą w 4°C. Następnie wirowano przy 1000 × g przez 15 minut w temperaturze pokojowej, odrzucano warstwę leukocytów, a masę erytrocytów płukano 3 × w PBS (o temperaturze 37°C lub 4°C, odpowiednio). Następnie sporządzano 2% zawiesinę erytrocytów z dodatkiem 2% surowicy płodowej cielęcej (fetal calf serum, FCS, Serva). Na mikropłytkach U (Nunc), w dwukrotnych powtórzeniach sporządzano szeregi rozcieńczeń podwójnych (uprzednio inaktywowanych oraz wykazujących brak aglutynacji z krwinkami zdrowych psów) surowic kozich anti-IgG, IgM i C3 dopełniacza (Immunology Consultants Laboratory, Inc., USA) od 1 : 10 do 1 : 1280, w objętości 15 µl/dołek. Do kolejnych dołków наносzono po 15 µl odpowiednio przygotowanej zawiesiny erytrocytów pacjenta. Inkubację prowadzono w 37°C i 4°C, odczyt wykonywano po 2 godzinach, po czym płytkę inkubowaną w 37°C przenoszono do temperatury pokojowej. Odczyt potwierdzano po 18 godzinach inkubacji. Aglutynację oceniano jako bardzo silną (++++), silną (+++), umiarkowaną (++) , słabą (+) lub brak (-). Za wynik dodatni uznawano reakcję dodatnią (co najmniej +) w rozcieńczeniu 1 : 80 i wyższym.

Badania na obecność przeciwciał antyjądrowych. Obecność przeciwciał antyjądrowych (ANA – Antinuclear Antibodies) klasy IgG w surowicy psów oznaczano metodą immunofluorescencji, przy wykorzystaniu skrawków wątroby szczura (metodę zaadaptowano z Katedry i Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Akademii Medycznej we Wrocławiu). Skrojone w kriostacie skrawki wątroby szczura (6 µm) umieszczano na szkiełkach podstawowych i suszono w temperaturze pokojowej przez 2-18 godzin. Po wysuszeniu skrawki przechowywano do użycia w temperaturze -20°C, w eksykatorze. Przed wykonaniem testu szkiełka były ekwilibrowane w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Przygotowane w ten sposób skrawki pokrywano surowicą badaną w kolejnych rozcieńczeniach podwójnych, rozpoczynając od 1 : 40 i inkubowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Następnie szkiełka płukano 3 × 15 minut PBS z dodatkiem 1% albuminy bydlęcej. W kolejnym etapie preparaty inkubowano przez 60 minut z przeciwciałami kozimi anti IgG psa (H+L), znakowanymi fluoresceiną (Immunology Consultants Laboratory, Inc., USA). Następnie preparaty płukano wg opisanej procedury i zamykano w mieszaninie PBS : glicerol (1 : 1) pod szkiełkiem nakrywkowym. Jako kontrolę dodatnią stosowano pulę surowic psów wykazujących obecność przeciwciał antyjądrowych, jako kontrolę ujemną pulę surowic młodych psów nie wykazujących obecności ANA w surowicy. Obecność fluorescencji jąder komórek wątrobowych oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon Eclipse E400. Intensywność fluorescencji oznaczano jako (+++) – silna; (++) – umiarkowana; (+) – słaba; (-) brak. Za wynik dodatni uznawano reakcję na co najmniej (+) w rozcieńczeniu 1 : 80.

Krażące kompleksy immunologiczne oznaczano wg Levinson i Goldman (10, 11) z wykorzystaniem glikolu polietylenowego (PEG 6000). Absorbancję białka oznaczano przy długości fali 280 nm. Stężenie CIC wyliczano ze wzoru:

$$\text{CIC} = \frac{\text{absorbancja przy 280 nm}}{4,284 \text{ mg/ml}}$$

Za wynik dodatni uznawano wartości absorbancji przekraczające 0,2, co odpowiada 0,047 mg/ml.

Badania immunohistochemiczne. Utrwalone w 10% zbuforowanej formalinie wycinki skóry lub narządu opracowywano wg standardowej procedury histopatologicznej, tj. odwadniano w acetonie i prześwietlano w ksylenie, zatopiono w parafinowe bloczki i cięto na skrawki grubości 5 µm umieszczane na szkiełku podstawowym. Następnie skrawki te odparafinowywano w ksylenie, uwadniano w malejącym szeregu alkoholi i przeprowadzano do wody destylowanej. Tak przygotowane skrawki inkubowano w roztworze PBS zawierającym 10% surowicy króliczej przez 1 godzinę. Po zlanie roztworu i osuszeniu наносzono przeciwciała kozy anti-IgG psa znakowane fluoresceiną (Immunology Consultants Laboratory, Inc., USA) rozcieńczone PBS z dodatkiem 0,02% Tween-20 oraz 1% albuminy bydlęcej i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Preparat płukano 3 × 5 minut w PBS z dodatkiem 0,02% Tween-20 oraz 1% albuminy bydlęcej. Następnie preparat osuszano i zalewano mieszaniną PBS z gliceryną (60 : 40), nakładano szkiełko nakrywkowe i oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon Eclipse E400.

Wyniki i omówienie

Wyniki oznaczania przeciwciał antyerytrocytarnych przedstawiono w tab. 1. Reakcja dodatnia w teście Coombsa była stwierdzana najczęściej w klasie IgG, co jest zgodne z danymi piśmiennictwa (3, 20), w tej klasie występowały też najwyższe miano (najwyższe potwierdzone miano to 1 : 10 240, ale w kilku przypadkach nie sprawdzano miana maksymalnego ze względu na zbyt małą objętość uzyskanych krwinek, przyjmując wartość maksymalną wykonanych rozcieńczeń – 1 : 1280). W większości przypadków miano aglutynacyjne było o 1 rozcieńczenie wyższe w temperaturze 4°C niż 37°C. Wynik pozytywny w klasie IgG przy jednocześnie negatywnej reakcji w układach wykrywających IgM i C3 dopełniacza wskazuje na rolę przeciwciał antyerytrocytarnych w patogenezie niedokrwistości. W przypadkach niedokrwistości o charakterze pierwotnym (AIHA, Autoimmune Hemolytic Anemia) można spodziewać się też wysokiego miana przeciwciał. Jednoczesna reakcja w klasach IgG + IgM może wskazywać na wczesny etap procesu autoagresji i wymaga ponownej kontroli. W przypadku reakcji w układach IgG + C3, IgM + C3 czy IgG + IgM + C3, można oczekiwać procesu niezwiązanego bezpośrednio z przeciwciałami antyerytrocytarnymi, a raczej stanu, w którym erytrocyty są przejściowo uszkodzane w wyniku powinowactwa antygeny swoistego dla przeciwciał do błony komórkowej erytrocytów (prof. Wolfgang Leibold – informacja ustna). Spośród pacjentów badanych aż 38,5% wykazało dodatni wynik testu Coombsa, co potwierdza znaczącą rolę reakcji z autoagresji w patogenezie niedokrwistości u psów. W prezentowanym materiale w 4 przypadkach wystąpiła reakcja jednocześnie w klasie IgG + C3, w 2 przypadkach IgG + IgM + C3, a tylko w jednym IgG + IgM. W obu ostatnich układach reakcje wykazywały wysokie miano (1 : 640 i wyższe).

W tab. 2 zamieszczono wyniki oznaczania przeciwciał antyerytrocytarnych, przeciwciał antyjądrowych i krążących kompleksów immunologicznych u psów podzielonych na podstawie klinicznego rozpoznania patologii.

W podziale grup przypadków kierowano się głównym rozpoznaniem/podejrzeniem, niekiedy jednak trudno było jednoznacznie określić rodzaj schorzenia, dlatego część przypadków została zakwalifikowana do dwóch kategorii jednocześnie, np. niedokrwistość często towarzyszyła nowotworom lub toczeniowi rumieniowatemu (4, 13, 16). Należy podkreślić, że w przypadkach zdiagnozowanych klinicznie jako IMHA/podejrzenie IMHA, u ponad 78% pacjentów stwierdzono dodatni wynik testu Coombsa, przy czym miano były w większości przypadków wysokie (1 : 640 i wyższe).

Tab. 1. Oznaczanie przeciwciał antyerytrocytarnych testem Coombsa

Zakres badania (n)	W tym reakcje dodatnie – miano $\geq 1 : 80$ n (%)	Reakcje dodatnie w klasie IgG n (%)	Reakcje dodatnie wobec C3 dopełniacza n (%)	Reakcje dodatnie w klasie IgM n (%)
Anty-IgG (38)	9 (23,68)	9 (23,68)	nb	nb
Anty-IgG + C3 (129)	53 (41,09)	51 (39,53)	2 (1,55)	nb
Anty-IgG + IgM + C3 (48)	20 (41,67)	15 (31,25)	2 (4,17%)	3 (6,25)
Razem (213)	82/213 (38,5)	75/213 (35,21)	4/177 (2,26)	3/48 (6,25)

Objaśnienie: nb – nie badano

Tab. 2. Częstość występowania dodatnich wyników testów laboratoryjnych (liczba badanych/dodatnich (%)) w zdefiniowanych klinicznie stanach patologii psów

Diagnoza kliniczna	Test Coombsa	ANA	CIC
IMHA/podejrzenie IMHA	28/22 (78,57)	17/6 (35,29)	19/16 (84,21)
SLE/podejrzenie SLE	9/5 (55,56)	7/5 (71,43)	6/6 (100)
Zmiany skórne	21/5 (23,81)	7/2 (28,57)	6/3 (50)
Alergia	18/3 (16,67)	5/0 (0)	11/6 (54,55)
Zapalenia wielostawowe	14/9 (64,29)	11/4 (36,36)	9/6 (66,67)
Nowotwory	20/11 (55)	11/0 (0)	11/6 (54,55)

Jednocześnie tylko w sześciu na 17 przypadków stwierdzono obecność przeciwciał antyjądrowych (tab. 2). Z kolei wśród pacjentów z toczniem układowym lub jego podejrzeniem ponad 71% osobników wykazywało obecność przeciwciał antyjądrowych, co daje częstość występowania nieznacznie niższą od opisywanej w piśmiennictwie (8). Wszystkie psy z klinicznym rozpoznaniem SLE (100%) wykazywały podwyższone stężenia krążących kompleksów immunologicznych (nadwrażliwość typu III). Także w przebiegu IMHA bardzo wysoki odsetek psów wykazywał podwyższone wartości krążących kompleksów immunologicznych (tab. 2).

Spośród wybranych stanów klinicznych najrzadziej stwierdzano przeciwciała antyerytrocytarne w stanach alergicznych i przy zmianach skórnych. Przeciwciała antyjądrowych nie stwierdzono ani u psów alergików, ani u psów z nowotworami, chociaż w późniejszych badaniach własnych, zgodnie z oczekiwaniem, stwierdzono obecność ANA u psów z nowotworami. W większości przypadków chorób pęcherzowych negatywny wynik stwierdzano w zakresie wszystkich trzech parametrów przedstawionych w tab. 2, a jedynie badanie immunofluorescencyjne skrawka skóry pozwalało na potwierdzenie diagnozy klinicznej.

W przypadku psa o typowym obrazie klinicznym choroby pęcherzowej wykonano badanie immunohistochemiczne wycinka skóry pobranej z brzeżnej części zmian (ryc. 1). Lokalizacja autoreaktywnych immunoglobulin na granicy skóry właściwej i naskórka pozwoliła na zdiagnozowanie pemphigoidu. U tego samego psa nie wykryto ANA, a stężenie CIC mieściło się w zakresie normalnym.

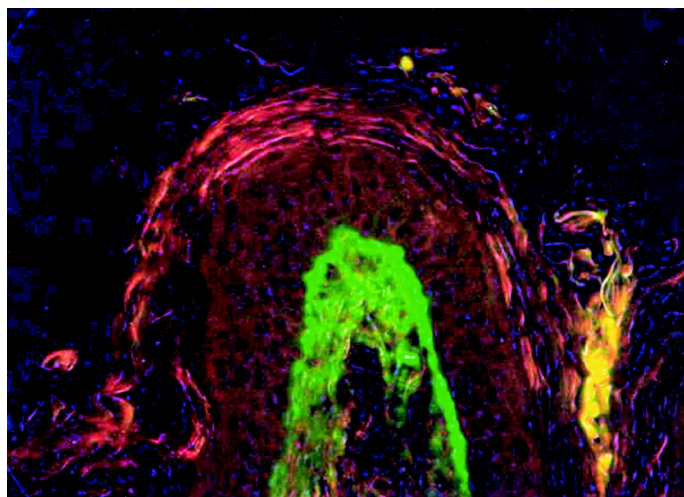
U psa poddanego eutanazji w okresie pogorszenia (niewydolność nerek) w przebiegu rozpoznanego klinicznie toczenia rumieniowatego, z silną reakcją przeciwciał antyjądrowych w surowicy, mianem przeciwciał antyerytrocytarnych klasy IgG 1 : 640 i stężeniem CIC 0,112 mg/ml wykonano badanie immunohistochemiczne nerki. Badanie to wykazało silne świecenie złogów kompleksów immunologicznych w komórkach kanalików nerkowych (ryc. 2).

Uzyskane dotychczas wyniki wykazały, że choroby z autoagresji stanowią istotny problem w patologii psów. Skłaniają do podejmowania dalszych badań na większej grupie pacjentów i potwierdzają przydatność w diagnozowaniu chorób z autoagresji, jak i w monitorowaniu przebiegu leczenia.

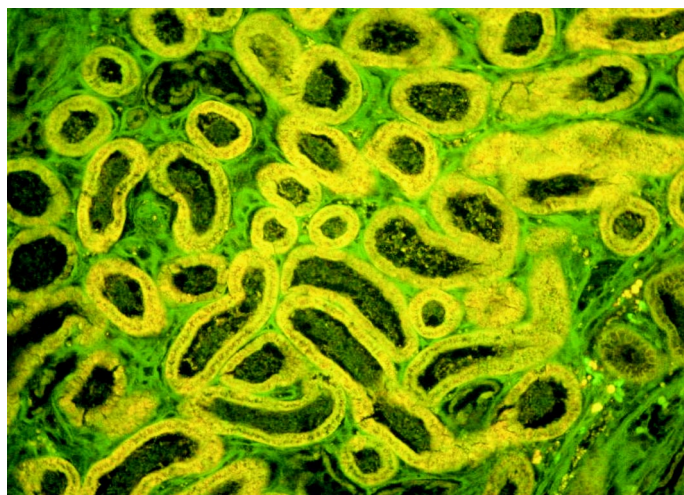
Prowadzona w Zakładzie diagnostyka jest podporządkowana potrzebom klinicznym, niedosyt budzi brak możliwości bardziej szczegółowego analizowania badanych przypadków (21). Istotną przyczyną jest brak dofinansowania diagnostyki i jednocześnie ograniczone możliwości finansowe właścicieli zwierząt. Szczególnie interesujące wydaje się rozpoczęcie diagnostyki przeciwciał antyjądrowych w oparciu o komórki HEp-2, a także analiza przeciwciał przeciw wybranym antygenom swoistym, co powinno zwiększyć możliwość różnicowania między SLE a chorobami SLE-podobnymi (6, 7). Zamierzamy także wdrożyć serologiczną diagnostykę przeciwciał związanych z chorobami pęcherzowymi.

Piśmiennictwo

1. Day M. J.: Antigen specificity in canine autoimmune haemolytic anaemia. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999, 69, 215-224.
2. Day M. J.: IgG subclasses of canine anti-erythrocyte, antinuclear and anti-thyroglobulin autoantibodies. *Res. Vet. Sci.* 1996b, 61, 129-135.
3. Day M. J.: Serial monitoring of clinical, haematological and immunological parameters in canine autoimmune haemolytic anaemia. *J. Small Anim. Pract.* 1996a, 37, 523-534.
4. Dodds W. J.: Autoimmune hemolytic diseases and other causes of immune-mediated anaemia: an overview. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1977, 13, 437-441.
5. Gerber B., Steger A., Hassig M., Glaus T. M.: Anwendung von humanem Immunglobulin bei Hunden mit primärer immunbedingter hamolytischer Anämie. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2002, 144, 180-185.
6. Hansson H.: Antinuclear antibodies: presence and specificity in autoimmune connective tissue disease in the dog. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999, 69, 225-228.
7. Hansson-Hamlin H., Lilliehook I., Trowald-Wigh G.: Subgroups of canine antinuclear antibodies in relation to laboratory and clinical findings in immune-mediated diseases. *Vet. Clin. Pathol.* 2006, 35, 397-404.
8. Henriksson E. W., Hansson H., Karlsson-Para A., Pettersson I.: Autoantibody profiles in canine ANA-positive sera investigated by immunoblot and ELISA. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998, 61, 157-170.
9. Lechowski R., Czumińska K., Żmudzka M., Narojek T.: Toczeń układowy u psa – opis przypadku. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 265-270.
10. Levinson S. S., Goldman J.: Absorbance nephelometry of immune complexes by reaction with anti-IgG after treatment with polyethylene glycol. *Clin. Chem.* 1983, 29, 2035-2039.



Ryc. 1. Obraz immunohistochemiczny skóry w przypadku pemphigoidu u psa



Ryc. 2. Obraz immunohistochemiczny nerki psa z układowym toczeniem rumieniowatym

11. Levinson S. S., Goldman J.: Anti-IgG type test to assay circulating immune complexes from polyethylene glycol precipitates compared with C1q binding and Raji cell tests. *Clin. Biochem.* 1984, 17, 341-344.
12. Łukaszewska J., Łukaszewski Z., Stefaniak T.: Niedokrwistości autoimmunohemolityczne u psów – przypadki własne. *Magazyn Wet.* 2004, 13, 96, 29-33.
13. Łukaszewska J., Popiel J., Stefaniak T., Atamaniuk W.: Niedokrwistości autoimmunohemolityczne u psów – analiza 48 przypadków. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 1020-1021.
14. Łukaszewska J., Stefaniak T., Taube M., Gaik K.: Toczeń rumieniowaty układowy u psów – zapalenie wielomięśniowe. *Magazyn Wet.* 2007, 16, 120, 20-23.
15. Łukaszewski Z., Łukaszewska J., Stefaniak T., Popiel J., Atamaniuk W.: Niedokrwistości autoimmunohemolityczne u psów – przypadki własne. *Cz. II. Magazyn Wet.* 2005, 14, 100, 16-18.
16. Malik R., Zunino P., Hunt G. B.: Complete heart block associated with lupus in a dog. *Aust. Vet. J.* 2003, 81, 398-401.
17. Monier J. C., Dardenne M., Rigal D., Costa O., Fournel C., Lapras M.: Clinical and laboratory features of canine lupus syndromes. *Arthritis Rheum.* 1980, 23, 294-301.
18. Płoneczka K., Śmiełowska-Łoś E., Kuropka P., Kuryszko J.: Diagnostyka choroby pęcherzowej psa przy wykorzystaniu cienkoigłowej biopsji skórnej. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 396-399.
19. Weinkle T. K., Center S. A., Randolph J. F., Warner K. L., Barr S. C., Erb H. N.: Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002). *JAVMA* 2005, 226, 1869-1880.
20. Wilkerson M. J., Davis E., Shuman W., Harkin K., Cox J., Rush B.: Isotype-specific antibodies in horses and dogs with Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *J. Vet. Intern. Med.* 2000, 14, 190-196.
21. Zabek J.: Celowość oznaczania surowiczych autoprzeciwciał niezaliczanych do kryteriów diagnostycznych układowych chorób tkanki łącznej. *Reumatologia* 2006, 44, 343-348.

Adres autora: prof. dr hab. Tadeusz Stefaniak, ul. Abrahama 41, 52-211 Wrocław; e-mail: tadstef@ozi.ar.wroc.pl