

Методы диагностики и мониторинга первичных иммунодефицитов

Заведующая кафедрой
клинической лабораторной
диагностики, д.м.н., профессор
Новикова И.А.



Иммунодефициты

Это выпадение или недостаточность функции одного или несколько элементов иммунной системы

Первичные ИД – генетически детерминированные дефекты в иммунной системе

Распространенное суждение:

- Редкие
- Преимущественно у детей
- Клинически проявляются тяжелыми инфекциями



Частота встречаемости ПИД

Заболевание	Частота встречаемости	Возраст диагностики
<u>Нарушения гуморального иммунитета:</u>		
- ОВИД	1:10000 – 1:50000	>2 лет, чаще 20-30 лет
- Селективный дефицит IgA	1:300 – 1:700	>4 лет
- Болезнь Брутона	1:50000 – 1:100000	>6 мес
<u>T-клеточные и комбинированные дефекты:</u>		
- Тяжелый комбинированный ИД	1:100000 – 1:500000	<6 мес
- Синдром Вискотта-Олдрича	?	<6 мес

Частота встречаемости ПИД (продолжение)

Заболевание	Частота встречаемости	Возраст диагностики
- Атаксия - телеангиэктазия	?	>5 лет
- X-сцепленный гипер-IgM	?	Варьирует
<u>Дефекты фагоцитоза:</u> - Хронический грануломатоз	1:200000	Чаще <5 лет, реже 20-30 лет
Дефекты компонента	Варьирует	Любой возраст



Клинические проявления иммунодефицитов

1. Повышенная чувствительность к инфекциям:
 - ❖ Необъяснимые хронические рецидивирующие инфекции
 - ❖ Инфекции, вызываемые низковирулентными возбудителями или редкими возбудителями
 - ❖ Чрезвычайно тяжелое течение инфекций
2. Аутоиммунные или воспалительные заболевания
3. В составе синдрома комплекса



Инфекционный синдром при СПИД

**Недостаточность гуморального
иммунитета**

Недостаточность фагоцитов

Недостаточность комплемента

**Повышена восприимчивость
к бактериальным
инфекциям (особенно
пиогенным)**

**Недостаточность клеточного
иммунитета**

**Комбинированная недостаточность
гуморального и клеточного
иммунитета**

**Повышена восприимчивость
к непатогенным в норме
микроорганизмам (вирусы,
дрожжи, простейшие и др.)—
оппортунистические
инфекции**

Спектр микробной флоры при иммунодефицитах

Тип инфекции	Нарушенное звено иммунитета	Локализация
<p><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterobacter species</i> <i>Klebsiella species</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Salmonella species</i> Грибки: □ <i>Aspergillus species</i> □ <i>Scedosporium species</i> □ <i>Trichosporon species</i></p>	Фагоциты	Легкие, ЖКТ, печень, лимфоузлы, кожа, пазухи, ГОЛОВНОЙ МОЗГ
<p><i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i></p>	Гуморальный иммунитет (нарушение в системе В-лимфоцитов)	Легкие, кожа, кровь, ЖКТ

Спектр микробной флоры при иммунодефицитах

Mycobacteria Salmonella species Listeria monocytogenes Toxoplasma gondii Pneumocystis jiroveci Грибки Вирусы	Клеточный иммунитет или нарушение в системе Т-лимфоцитов	Легкие, кожа, лимфоузлы, ЖКТ
Candida albicans Pneumocystis jiroveci Aspergillus species Вирусы	Комбинированный дефицит клеточного и гуморального иммунитета	Орофарингеальная локализация, кожа, легкие, пазухи, ЖКТ
Neisseria meningitidis Neisseria species Streptococcus pneumoniae Haemophilus influenzae	Система комплемента	Множественные локализации

Аутоиммунная манифестация ПИД

- Аутоиммунная гемолитическая анемия
- Аутоиммунная тромбоцитопения
- Аутоиммунный тиреоидит
- Васкулит
- Системная красная волчанка
- Ревматоидный артрит

Ассоциированные заболевания:

- Общий переменный иммунодефицит (ОВИД)
- Селективный дефицит IgA
- Хронический слизисто-кожный кандидоз
- Дефициты компонента (C1-C4)



ПИД в составе синдрома

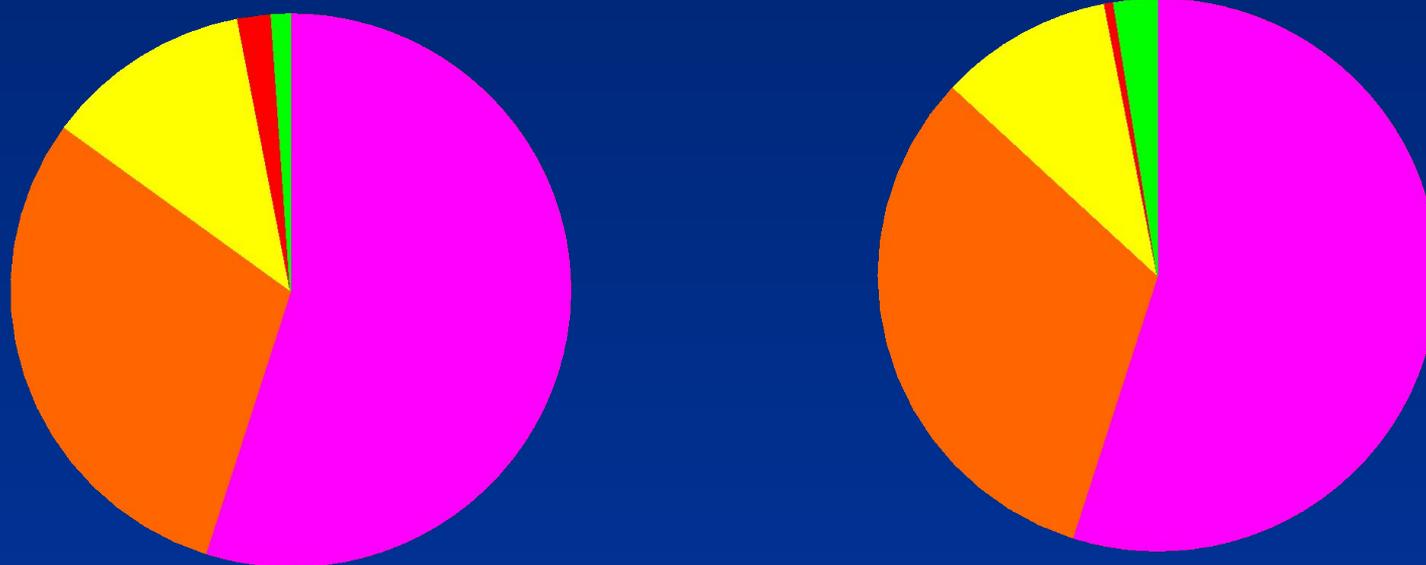
Синдромы	Клинические проявления	Дефект в иммунной системе
Синдром Ди-Джорджи	Врожденные пороки сердца Гипопаратиреоз Аномалии лица	Гипоплазия тимуса
С-м Вискотта-Олдрича	Тромбоцитопения Экзема	Дисфункции Т- и В-лимфоцитов
Атаксия-телеангиэктазия	Атаксия Телеангиэктазия	Дисфункции Т- и В-лимфоцитов
Синдром полиэндокринопатии	Дисфункции эндокринных органов	Хронический слизисто-кожный кандидоз

Классификация первичных иммунодефицитов

- Недостаточность гуморального иммунитета
- Комбинированная недостаточность гуморального и клеточного иммунитета
- Недостаточность Т-клеточного иммунитета
- Недостаточность фагоцитов
- Недостаточность комплемента
- Другие дефекты



Спектр различных видов первичных иммунодефицитов в Европе и России



■ - дефекты продукции антител

■ T-клеточные и комбинированные дефициты

■ - дефекты фагоцитоза

■ - дефекты комплемента

■ 5 - прочие дефекты

Первичные иммунодефициты у взрослых: настораживающие признаки

- ◆ Два или более свежих эпизодов инфекций уха в течение 1 года
- ◆ Два или более свежих эпизодов инфекций приносовых пазух в течение 1 года (при отсутствии аллергии)
- ◆ Один и более случаев пневмонии ежегодно
- ◆ Хроническая диарея с потерей веса
- ◆ Рецидивирующие вирусные инфекции
- ◆ Повторяющаяся потребность во внутривенном введении антибиотиков для купирования инфекции
- ◆ Персистирующий кандидозный стоматит или грибковые поражения кожи (или другой локализации)
- ◆ Тяжелые абсцессы кожи или внутренних органов
- ◆ Инфекции, вызванные обычно непатогенными микобактериями
- ◆ Первичный иммунодефицит в семейном анамнезе

Актуальность ранней диагностики

- Предотвратить органические поражения
- Спланировать тактику ведения
- Предоставить генетическую информацию семье пациента

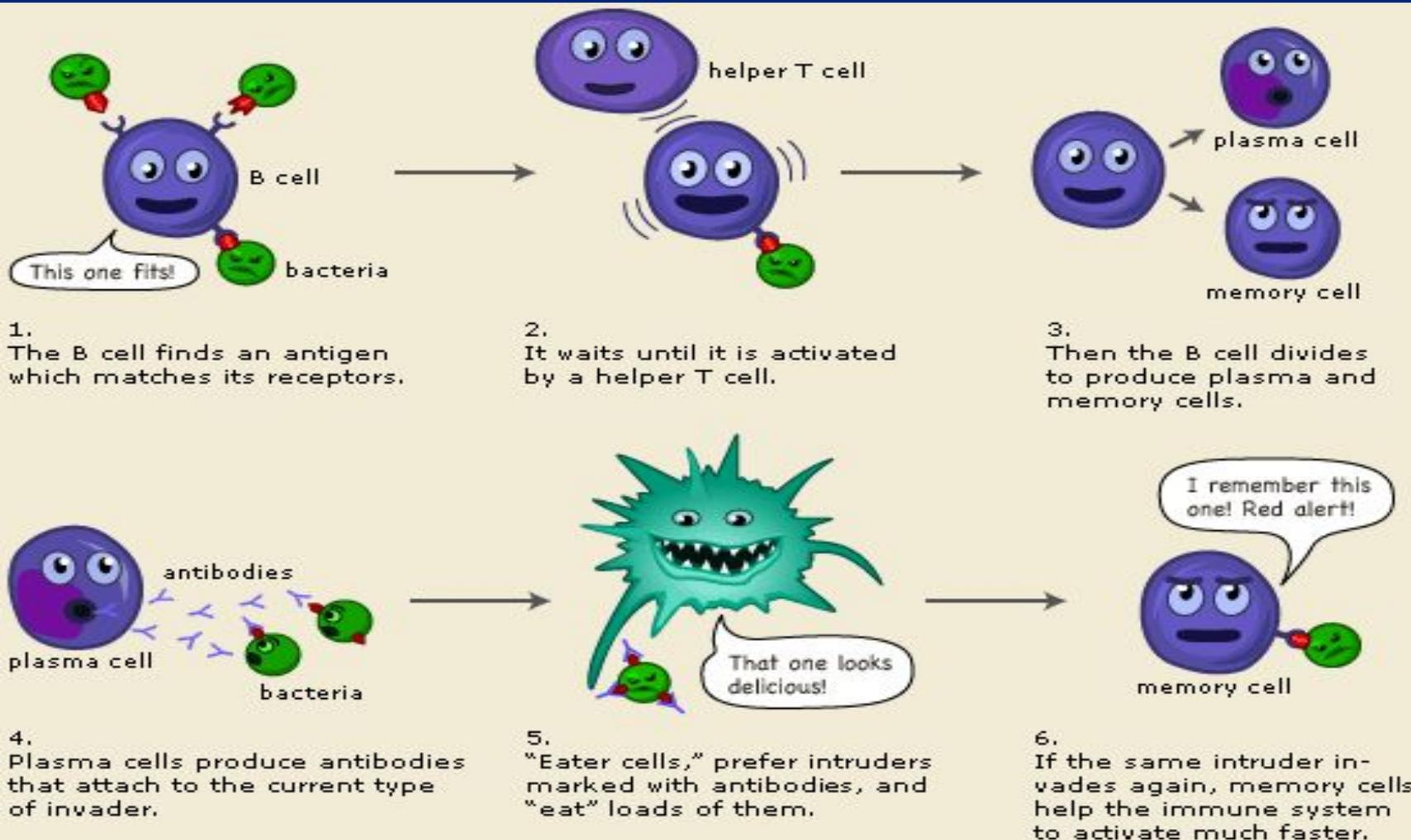


Скрининговые тесты для выявления

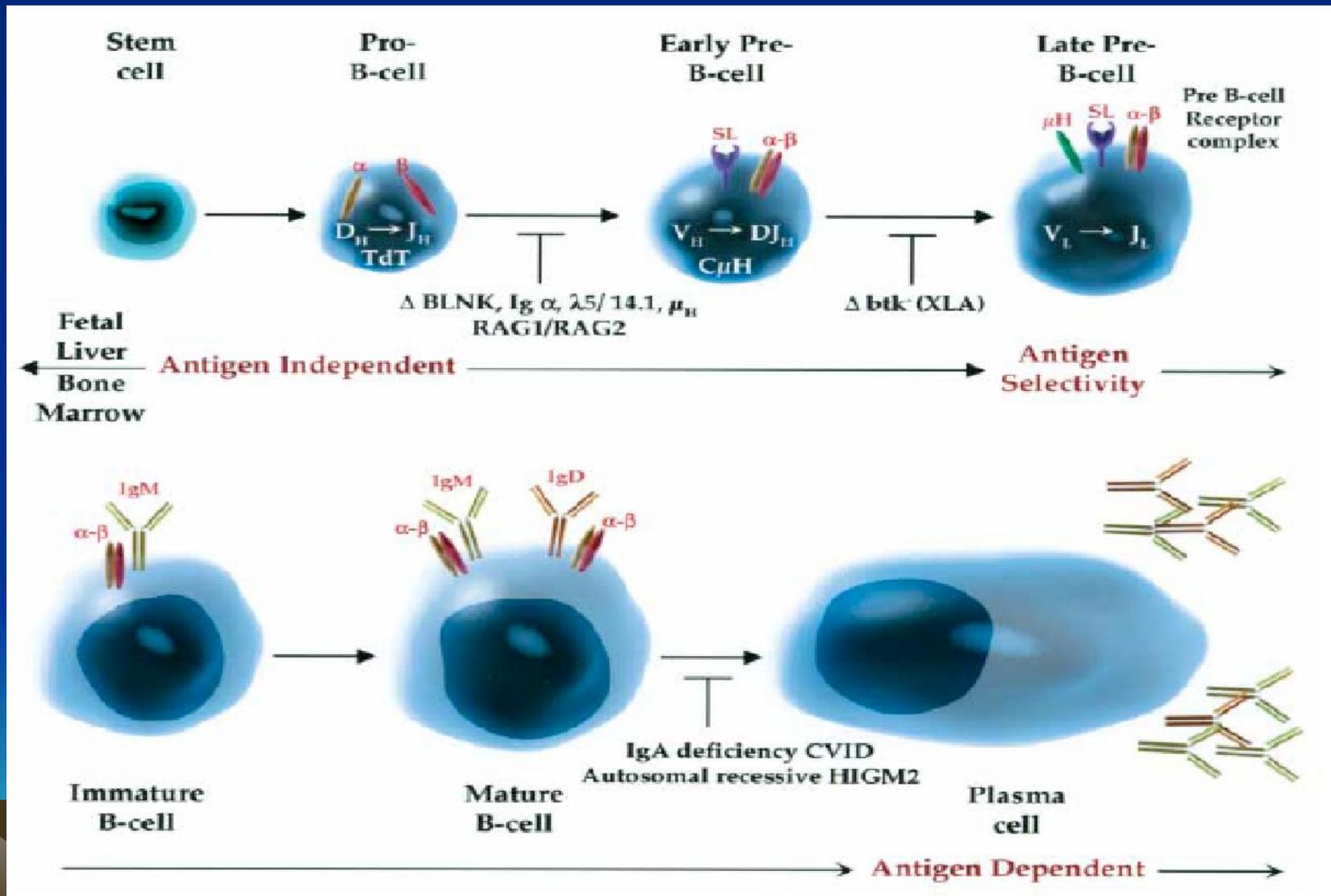
ПИД

Подозреваемый дефект	Тесты
Гуморальный иммунитет	Иммуноглобулины в сыворотке (А,М, G) <i>Титр поствакцинальных антител</i>
Клеточно-опосредованный иммунитет	ОАК (лимфопения) Т-лимфоциты (CD4, CD8) <i>Кожные тесты замедленной гиперчувствительности</i>
Фагоциты	ОАК (нейтропения, но может быть нейтрофилез) Тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест)
Комплемент	Общая гемолитическая активность компонента (CH ₅₀)

Взаимодействие клеток в иммунном ответе



Созревание В-клеток и дефекты, приводящие к нарушению антителопродукции



Показания к углубленному обследованию

- ❑ При нарушениях в скрининговых тестах
- ❑ Нормальные скрининговые тесты, но сохраняющаяся клиника иммунодефицита



Углубленная оценка В-клеточного звена

- Содержание иммуноглобулинов в сыворотке (Ig A, M, G)
- Содержание субклассов IgG (оценивается одновременно со способностью к продукции специфических антител)
- Определение специфических антител:
 - Изогемагглютинины - IgM к антигенам АВО
 - столбнячный анатоксин
 - пневмококковые полисахаридные антигены
 - Антитела к другим вакцинным антигенам:
 - гепатит В
 - корь
 - Антитела к респираторным вирусным агентам:
 - респираторно-синтициальный вирус
 - микоплазма
 - вирус гриппа
- Количество В-клеток в периферической крови (CD19,CD20, CD22)
- Молекулярно-генетические исследования (аномалии Btk и др.)

Свойства субклассов IgG

Свойства	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
% от общего кол-ва	60%	25%	10%	5%
Содержание г/л	2,2-10	0,5-8	0,05-0,9	0,0 – 0,02
Антитела к белковым АГ	++	+	++	+
Антитела к полисахаридным антигенам	+	++	+	+

Проблемы при определении субклассов IgG

- **Разнообразие результатов, полученных в различных лабораториях**
- **Не дает информацию о функции антител**
- **Высокая биологическая вариабельность содержания в плазме, особенно у детей**
- **Лаборатории не имеют референтных норм (с учетом возраста и специфики тестов)**



Дефекты продукции антител

Заболевание	Количество сывороточных иммуноглобулинов	В-клетки в крови	Дефект	Наследование
Болезнь Брутона	отсутствуют	<2%	Btk	X-сцепленные
Гипер-IgM синдром	IgM - ↑ (до 10 г/л) остальные снижены	N	Индукцируемая цитидин-деаминаза	Аутосомно-рецессивное
Общий переменный иммунодефицит	Вариабельно чаще IgA, IgG ↓↓↓	N, ↓	?	вариабельно
Дефицит IgA	IgA < 0,05 г/л	N	?	вариабельно
Транзииторная гипогаммаглобулинемия детей	IgG ↓, IgA ↓	N	?	?
Дефицит субклассов IgG	↓ субкласса IgG	N	?	?

Общий variabelный иммунодефицит

Группа состояний с выраженной недостаточностью синтеза антител.

Манифестация - от 10 до 30 лет и старше. Этиология неизвестна.

- **Клинические проявления:** высокая чувствительность к микробам, особенно *Haemophilus influenzae* *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*.
- **Локализация** - преимущественно поражения бронхо-легочной системы и ЛОР-органов+ мальабсорбция, лямблиоз с тяжелой диареей, непереносимость лактозы, аномалии ворсинок тонкой кишки.
- **Физикальное обследование** лимфоидная ткань нормально выражена или гипертрофирована.
- **Иммунологическое обследование** – IgG, IgM и IgA в сыворотке ↓↓↓. Количество В-клеток - N ↓. Количество Т-клеток - N ↓.

Лечение - иммуноглобулины внутривенно – 200-400 мг/кг массы тела 1 раз в месяц, симптоматическая терапия.



Селективный дефицит IgA

- Среди больных с дефицитом IgA: 30% - парциальный дефицит, 70% - полный.
- **Генетический дефект** – не определен. Детерминированность на уровне HLA-системы (гаплотип A1, B8, DR3).
- **Патогенез**: нарушение терминальной дифференцировки В-клеток (возможен дефицит CD40 на В-лимфоцитах).
- **Варианты течения** :
 - без клинических проявлений, по крайней мере, длительно
 - с клиническими проявлениями в виде рекуррентных инфекций
 - в составе синдромакомплекса (атаксия-телеангиэктазия)
 - в сочетании с гипер- IgM
- **Основные клинические проявления**:
 - рецидивирующие инфекции дыхательных путей и ЖКТ (целиакия, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона).
 - иммунокомплексная патология
- **Лабораторная диагностика** – IgA < 0,05 г/л, IgM, IgG, IgE – N;
Т и В – N. Пролиферация В ↓

Углубленное обследование при подозрении на Т-клеточный и комбинированный (Т-В) иммунодефицит

Популяции и субпопуляции Т-лимфоцитов (включая минорные) методом иммунофенотипирования

Уровень иммуноглобулинов А, М, G, Е в сыворотке

Состояние поствакцинального иммунитета (дифтерия, столбняк, гепатит В)

Кожные пробы ГЗТ на антигены (тест-системы, включающие столбнячный, дифтерийный, стрептококковый антигены, туберкулин, *Proteus mirabilis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*. (+) – исключает тяжелую недостаточность клеточного иммунитета; (-) - , тогда как отрицательная реакция диагностического значения не имеет

Пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на митогены (ФГА)

Продукция цитокинов Т-лимфоцитами и экспрессия цитокиновых рецепторов

НК-клетки: количество (иммунофенотипирование) и функциональная активность.

Обследование на ВИЧ



Т-клеточные и комбинированные ИД

Наименование	Лабораторные признаки
Синдром Ди-Джорджи	Лимфопения, CD4 ↓, CD8 ↓, пролиферативный ответ на митогены (-), реакции ГЗТ (-). Ig в сыворотке – N/↓.
Хронический слизисто-кожный кандидоз	Кожные тесты на Candida (-). Продукция цитокинов на Candida (-). Лимфоциты (количество) – N. Пролиферация на ФГА – N. Ig – N.
Тяжелый комбинированный иммунодефицит: X - сцепленный	T(-), B(+), NK(-), Ig↓↓↓, пролиферативный ответ на митогены ↓

Т-клеточные и комбинированные ИД (продолжение)

Наименование	Лабораторные признаки
ТКИД аутосомно-рецессивный (дефицит АДА)	Т(-), В(-), НК(-)
Атаксия-телеангиэктазия	Т↓, пролиферация на ФГА ↓, IgA,G ↓↓
Синдром Вискотта-Олдрича	Т и В (N/↓), изогемаагглютинины (↓/0). IgM, IgG ↓. Пролиферативный ответ на митогены ↓ (-).

Углубленное обследование при подозрении на дефект фагоцитов

- Подсчет количества нейтрофилов и особенностей их морфологии
- Оценка кислород-продуцирующей способности нейтрофилов (проточная цитометрия с дигидрородамином, хемилюминесценция)
- Оценка хемотаксиса нейтрофилов
- Выявление дефектов фагоцитоза
- Экспрессия молекул адгезии (CD11, CD18)
- Оценка бактерицидных свойств нейтрофилов (завершенность фагоцитоза)



Хроническая грануломатозная болезнь

- X-сцепленная форма заболевания ~ 70%
- Аутосомно-рецессивное наследование ~ 30%
- **Генетический дефект** – синтез NADPH-оксидазы → неспособность продуцировать кислородные радикалы
- **Клинические проявления:** гранулемы и абсцессы в различных органах ((S. aureus, Serratia, Klebsiella, Candida, Nocardia), затяжные гнойно-продуктивные процессы в легких (патогномоничный возбудитель – Aspergillus fumigatus)
- **Диагностика.** НСТ-тест (-). Т- и В в норме, уровень комплемента в сыворотке в норме.

Основные клинические проявления при дефиците компонента

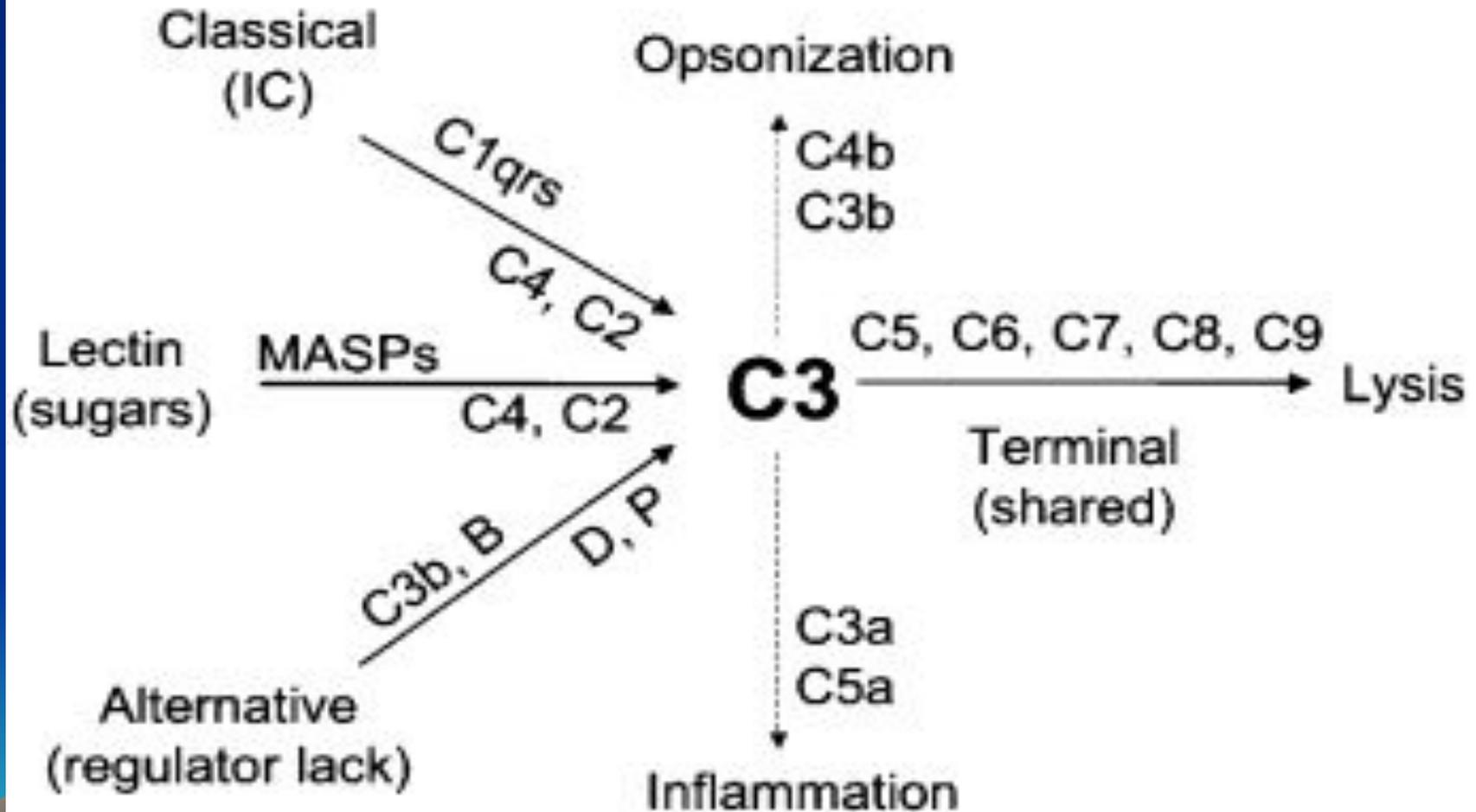
- **Инфекции**
- **Заболевания соединительной ткани (C1, C2, C4)**
- **Ангионевротический отек (C1- ингибитор)**
- **Мембранопролиферативный гломерулонефрит (C3)**
- **Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ингибитор МАК)**



Спектр возбудителей при дефиците компонента

Компонент компонента	Типичный возбудитель
C1q, C2, C3, C6	Пневмококи
C3	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>N. meningitides</i>
C1q, C3, C4	<i>S. aureus</i>
C5, C6, C7, C8	Гонококки
C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9, P	Менингококки
C2, C3, I, D	Гемофильные палочки
C3, C7	Кишечная палочка, цитомегаловирусы
C4	Кишечная палочка, сальмонеллы
C2	Протей
C2, P	Микобактерии туберкулеза, бруцеллы, токсоплазмы
C6	Грибы рода кандида
C1	Лямблии

Схема путей активации комплемента



Углубленное обследование при подозрении на дефицит компонента

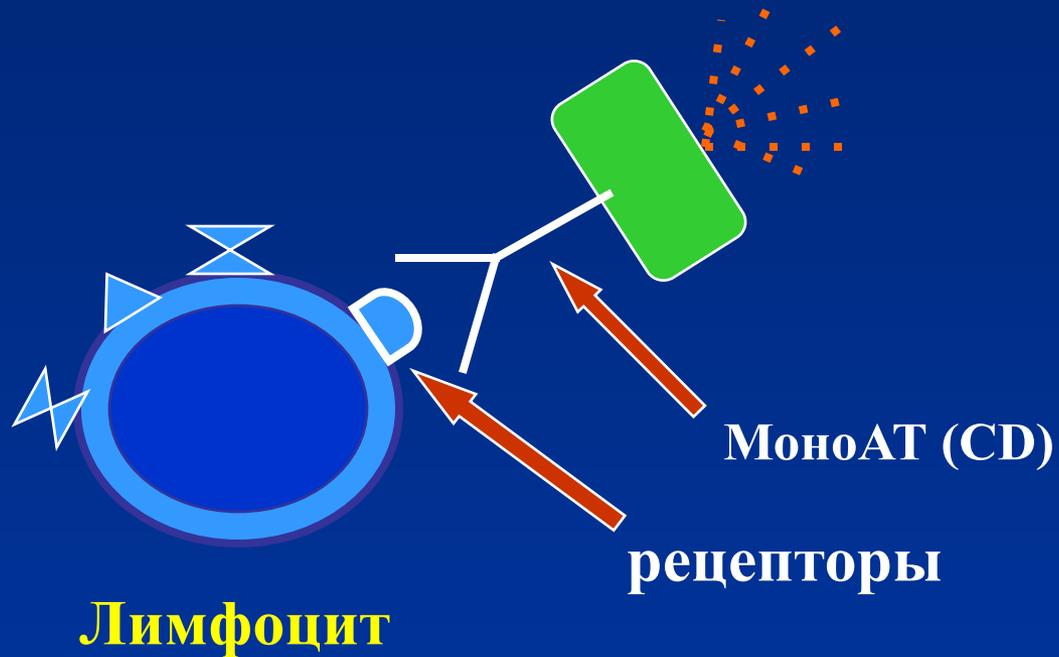
- 1. Оценка общей гемолитической активности компонента. Показатель СН50 соответствует количеству сыворотки крови, необходимому для лизиса 50% эритроцитов-мишеней. Оценивает общую активность обоих путей активации (альтернативного и классического).
- 2. Определение С3 и С4. Позволяет определить путь, в котором локализуется дефект компонента. Пробы следует проводить, если показатель СН50 не соответствует норме.
- 3. Определение концентрации С1-ингибитора и его функции (при подозрении на ангионевротический отек).
- 4. Определение других компонентов компонента.

Общая схема оценки иммунного статуса при подозрении на ПИД в РНПЦ РМ и ЭЧ

1. Количество Т-клеток, В-клеток, НК, субпопуляций Т-клеток (иммунофенотипирование)
2. Содержание IgA, IgM, IgG в сыворотке (турбидиметрически)
3. Определение активности фагоцитов (фагоцитоз, НСТ-тест)
4. Определение С3, С4 (по запросу)



Определение клеточных маркеров с помощью МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ



**CD –(*cluster designation*)-групповая метка-
моноклональные антитела или группа антител,
которые специфически связываются с определенным
рецептором.**

Иммунофенотипирование

Лейкоциты $\times 10^9/\text{л}$, лимфоциты %,
лимфоцитарные ворота /CD45+CD14-/

CD-маркеры	Нормальные значения
CD3+	T-лимфоциты
CD3+CD4+	T-хелперы
CD3+CD8+	T-цитотоксические
CD19+	B-лимфоциты
CD3-CD16+CD56+	NK-клетки
CD3+CD4+CD25+	Естественные регуляторные T-клетки (T-reg)
CD3+ $\gamma\delta$ TcR	$\gamma\delta$ T-лимфоциты
CD3+HLA-DR+	Активированные T-лимфоциты
CD3+CD16+CD56+	T-клетки с фенотипом NK

Широкий диапазон нормальных значений



Нормальные значения субпопуляционного состава лимфоцитов

Параметр	Содержание в %		
	Центральное значение	Интервал нормы	
		25-75	5-95
CD3+	70,3	66,0–75,0	57,4–79,9
CD3+4+	41,5	35,4–46,6	30,4–54,5
CD3+8+	23,9	20,8–26,8	17,0–34,0
CD19+	10,9	9,1–12,4	6,5–16,2
NK	13,8	8,8–17,1	5,6–24,3

***БЛАГОДАРЮ
ЗА ВНИМАНИЕ !!!***



