

**Современные подходы к  
иммунодиагностике  
заболеваний иммунной  
системы**

**Пинегин Б.В.**

**ФГБУ «ГНЦ - Институт иммунологии»  
ФМБА России, Москва**

# Заболевания иммунной системы:

## Иммунодефициты

Аллергические заболевания

Аутоиммунные заболевания

Лимфопролиферативные  
заболевания



**Петров Р.В.,**

**Лопухин Ю.М., Чередеев А.Н.,  
Ковальчук Л.В., Лебедев К.А.**

**Оценка иммунного статуса человека.**

**Методические рекомендации.**

**Москва. 1984.**



## Тесты 1-го уровня (Петров Р.В. и др. 1984)

**Анализ крови**

Относительное и абсолютное число лимфоцитов

**Фагоцитоз**

Определение фагоцитарной активности лейкоцитов

**Иммуно-  
глобулины**

Определение концентрации сыровоточных иммуноглобулинов (M, G, A)

**Субпопуляции  
лимфоцитов**

Тесты Е- и ЕАС-роzetkoобразовани-  
я для определения Т- и В-лимфоцитов  
крови

## **Скрининговые тесты по R.Hong (1987).**

- 1. Определение количества лимфоцитов.**
- 2. ГЗТ с помощью кожных проб.**
- 3. Уровень Ig и специфических антител.**
- 4. R-скопия грудной клетки на наличие тимуса.**

## **Скрининговые тесты по Т.А.Fleisher и J.B.Oliveira (2004).**

- 1. Клинический анализ крови.**
- 2. Классы Ig и специфические антитела.**
- 3. Субпопуляции лимфоцитов.**
- 4. ГЗТ с помощью кожных проб (столбнячные, коревые АГ и кандиды).**
- 5. Тесты на ВИЧ.**

# Минимальный набор тестов для оценки иммунитета (тесты 1-го уровня, Петров Р.В. и др., 1996)

**Фагоцитоз**

поглотительная и бактерицидная  
активность, активные формы O<sub>2</sub>

**Комплемент**

гемолитическая активность

**Иммуно-  
глобулины**

IgG, IgA, IgM, IgE

**Субпопуляции  
лимфоцитов**

CD3, CD4, CD8, CD19

## Основные виды первичных иммунодефицитов:

- X-сцепленная агаммаглобулинемия
- общая переменная иммунологическая недостаточность
- хроническая грануломатозная болезнь
- гипер-IgM-синдром
- селективный дефицит IgA
- тяжелый комбинированный иммунодефицит
- синдром Вискотт-Олдрич
- дефициты в системе комплемента

# ПЕРВИЧНЫЕ ИММУНОДЕФИЦИТЫ.

Диагностические критерии X-сцепленной агаммаглобулинемии  
(*Europ.Soc.Immunodef., Pan Ammer.Group. Immunodef.1999*)

## Достоверные тесты:

- мутации в Btk-гене;
- отсутствие Btk мРНК в нейтрофилах или моноцитах;
- отсутствие Btk белка в моноцитах.

## Вероятностные тесты:

Мальчики с % В-клеток меньше 2-х:

- с началом рецидивирующих инфекций в течение первых 5 лет жизни;
- уровни IgG, IgA, IgM на 2  $\delta$  ниже нормального;
- отсутствие изогемагглютининов.

# Оценка иммунного статуса с помощью проточной цитометрии (ПЦ)



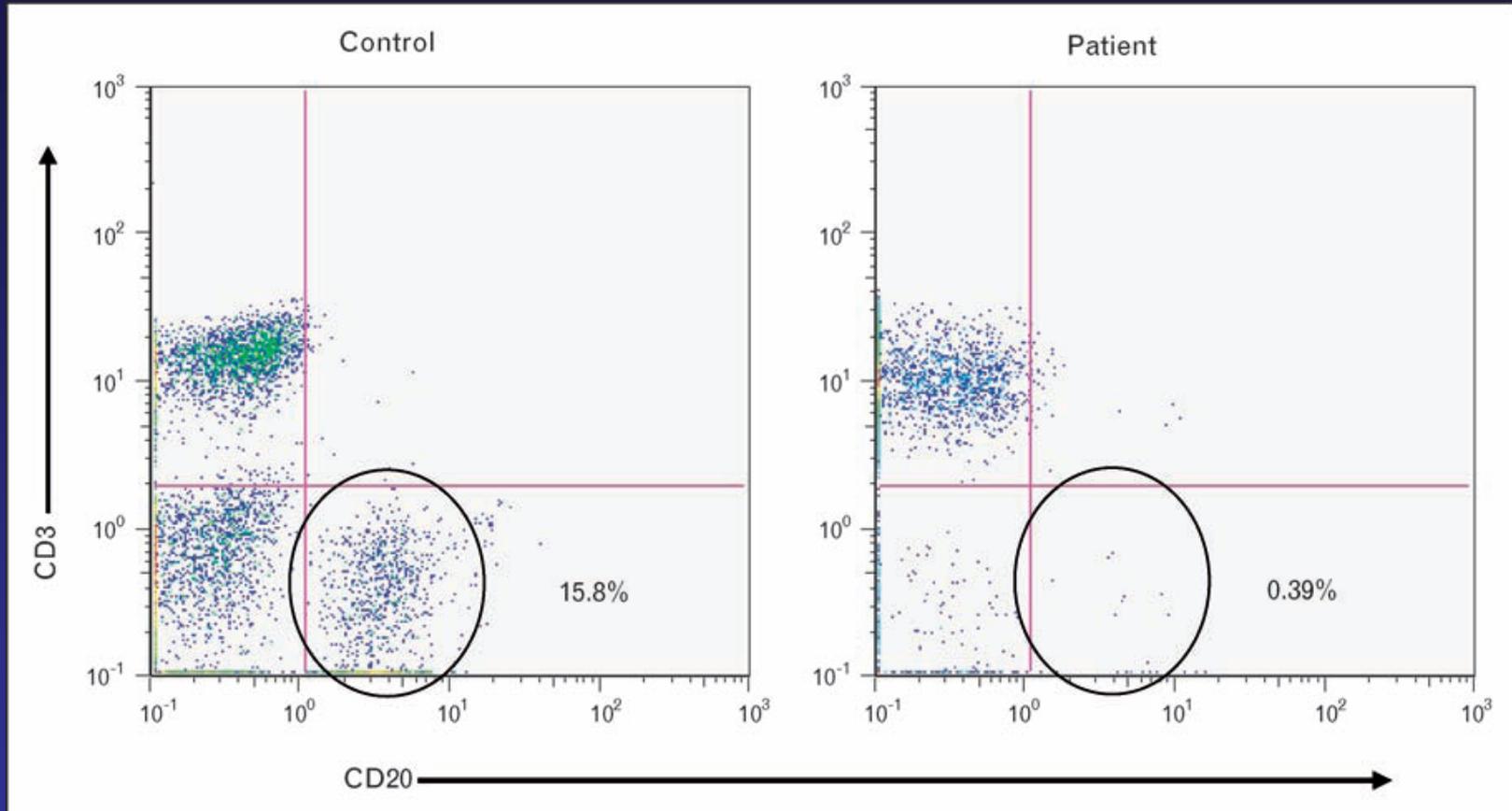
# 1. Применение проточной цитометрии в диагностике

№	Заболевание	Параметр	Клиника
1.	Х-сцепленная агаммаглобулинемия (XLA)	CD19, CD20 <2%	Бактериальные инфекции околоносовых пазух и бронхолегочного тракта
2.	Общая переменная иммунная недостаточность (CVID)	CD19, CD20 >2% ICOS, TACI, CD19	Бактериальные инфекции околоносовых пазух и бронхолегочного тракта
3.	Гипер IgM-синдром (HIGM)	CD40L (CD154), CD40	Бактериальные инфекции околоносовых пазух и бронхолегочного тракта
4.	Тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (SCID)	γ-цепь (CD132) рецепторов IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15	Рекуррентные оппортунистические инфекции, диарея, недоразвитие
5.	Синдром Вискотт-Олдрич (WAS)	WASP	Инфекции, экзема, тромбоцитопения, >>IgE
6.	Дефекты адгезии лейкоцитов (LAD)	CD11a/CD18, CD11b/CD18, CD11c/CD18	Рекуррентные бактериальные и грибковые инфекции, отсутствие гноя

## 2. Применение проточной цитометрии в диагностике

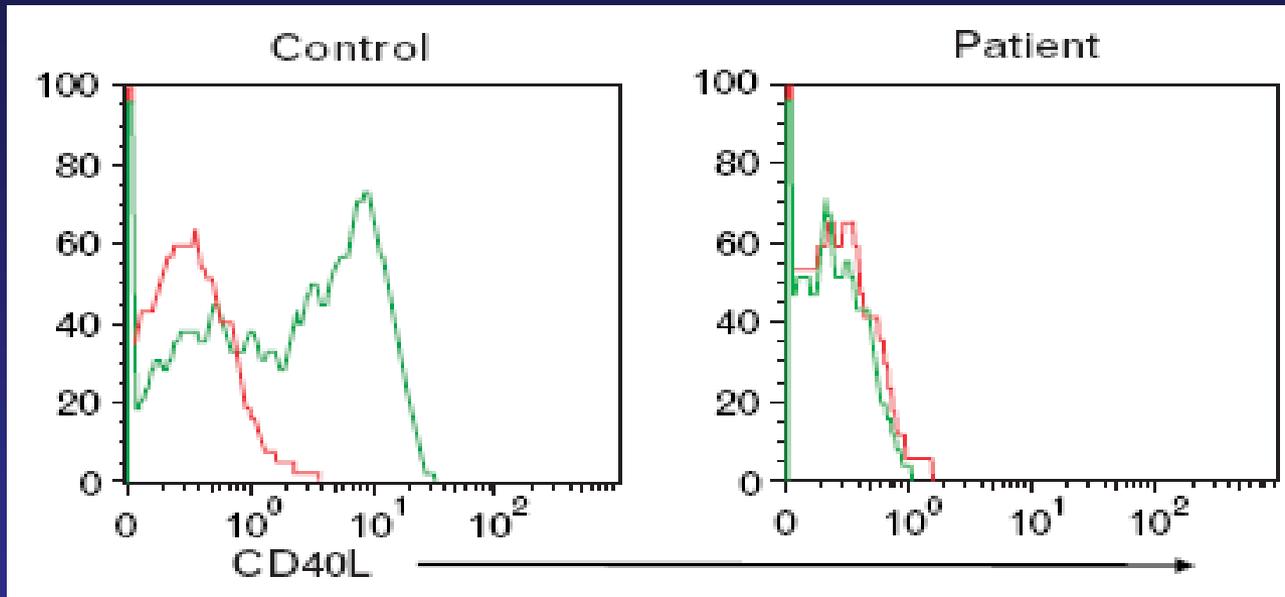
№	Заболевание	Параметр	Клиника
7.	Дефекты пути IL-12/23-IFN $\gamma$	IFN $\gamma$ R1 (CD119) IL-12R $\beta$ 1 (CD212) STAT1	Инфекции , вызванные апатогенными микобактериями и сальмонеллами
8.	IPEX-синдром	Транскрипционный фактор FOXP3 CD4 CD25	X-сцепленный иммунодефицит, полиэндокринопатия, энтеропатия, экзематозный дерматит
9.	Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS)	FASR (CD95) FASL (CD178)  $\alpha/\beta$ TCR CD4-CD8-	Лимфаденопатия, спленомегалия, аутоиммунитет, лимфоидные опухоли
10.	X-сцепленный лимфопролиферативный синдром (XLP)	SLAM-ассоциированный белок (SAP) и X-сцепленный ингибитор апоптоза (XIAP)	Инфекция EBV, гипогаммаглобулинемия, лимфомы
11.	Хроническая грануломатозная болезнь	Активные формы кислорода – продукты NADPH-оксидазы	Тяжелые бактериальные и грибковые инфекции (St.aureus, Serratia marcesens, Burkholderia cepacia, Aspergillus, Nocardia)

# Lack of B cells in congenital agammaglobulinemia



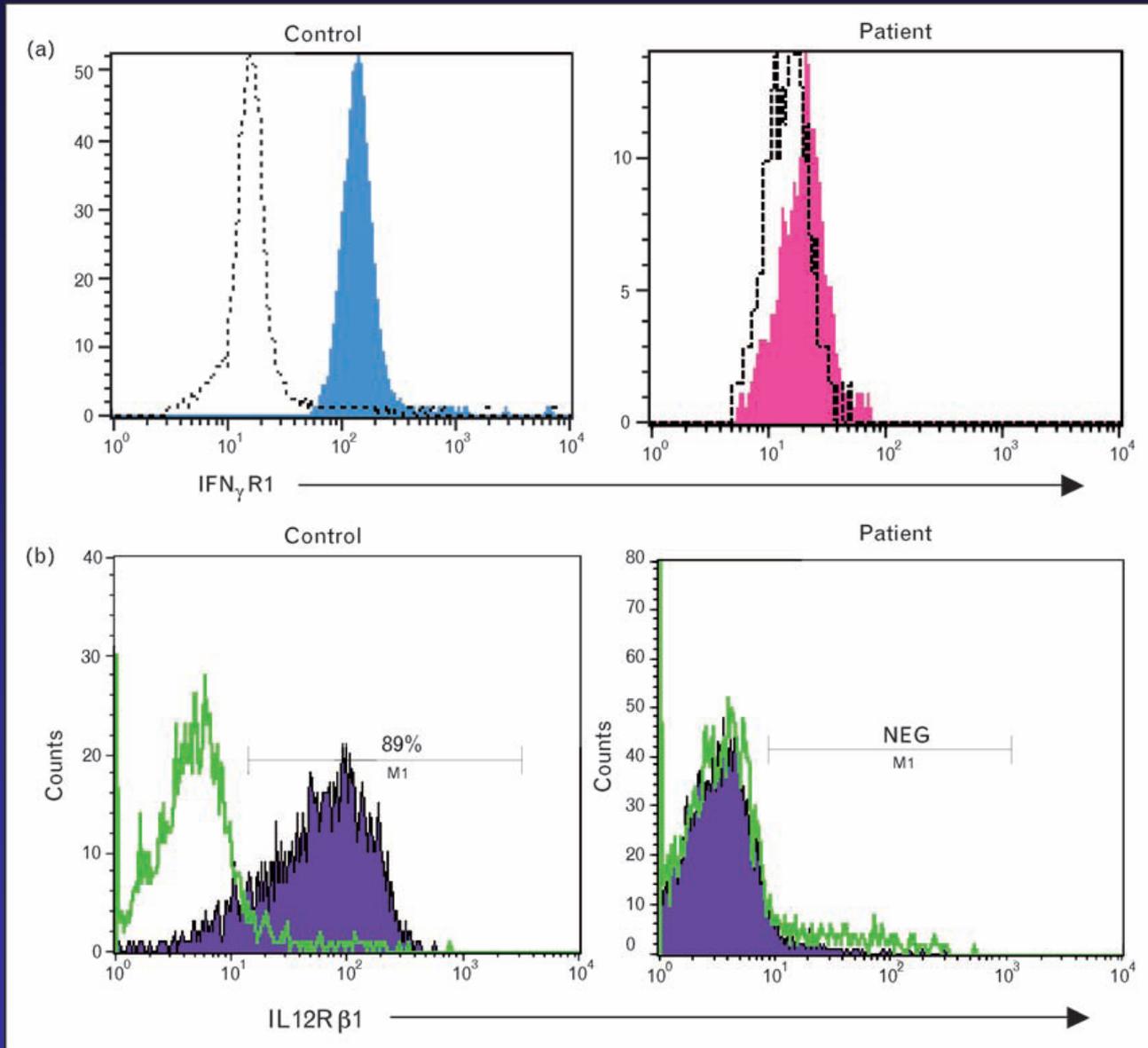
**CD3 and CD20 two color staining of lymphocytes from a control and a patient with XLA. The patient demonstrates virtual absence of B cells (CD20+CD3-) but normal T cells (CD3+CD20-). XLA, X-linked agammaglobulinemia.**

# X-linked hyper immunoglobulin M syndrome



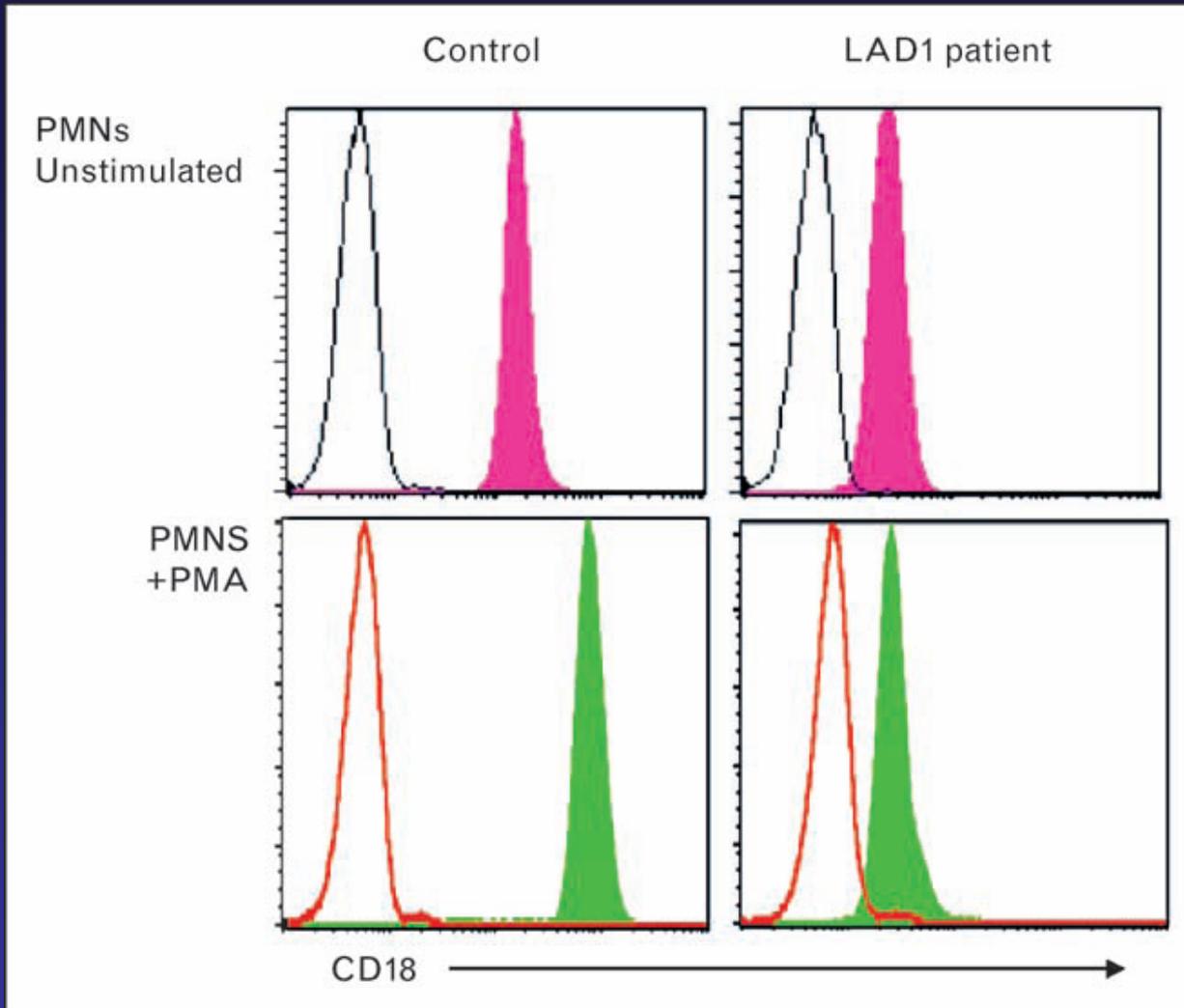
**Absent CD40L (CD154) expression on the surface of activated CD4<sup>+</sup> T cells of a HIGM1 patient, as compared with a control using PBMCs activated by PMA and ionomycin. ■, T-cell activation; ■, baseline. HIGM, hyper immunoglobulin M syndrome; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PMA, phorbol myristate acetate.**

# Identification of IL-12/23-IFN-g axis defects by flow cytometry



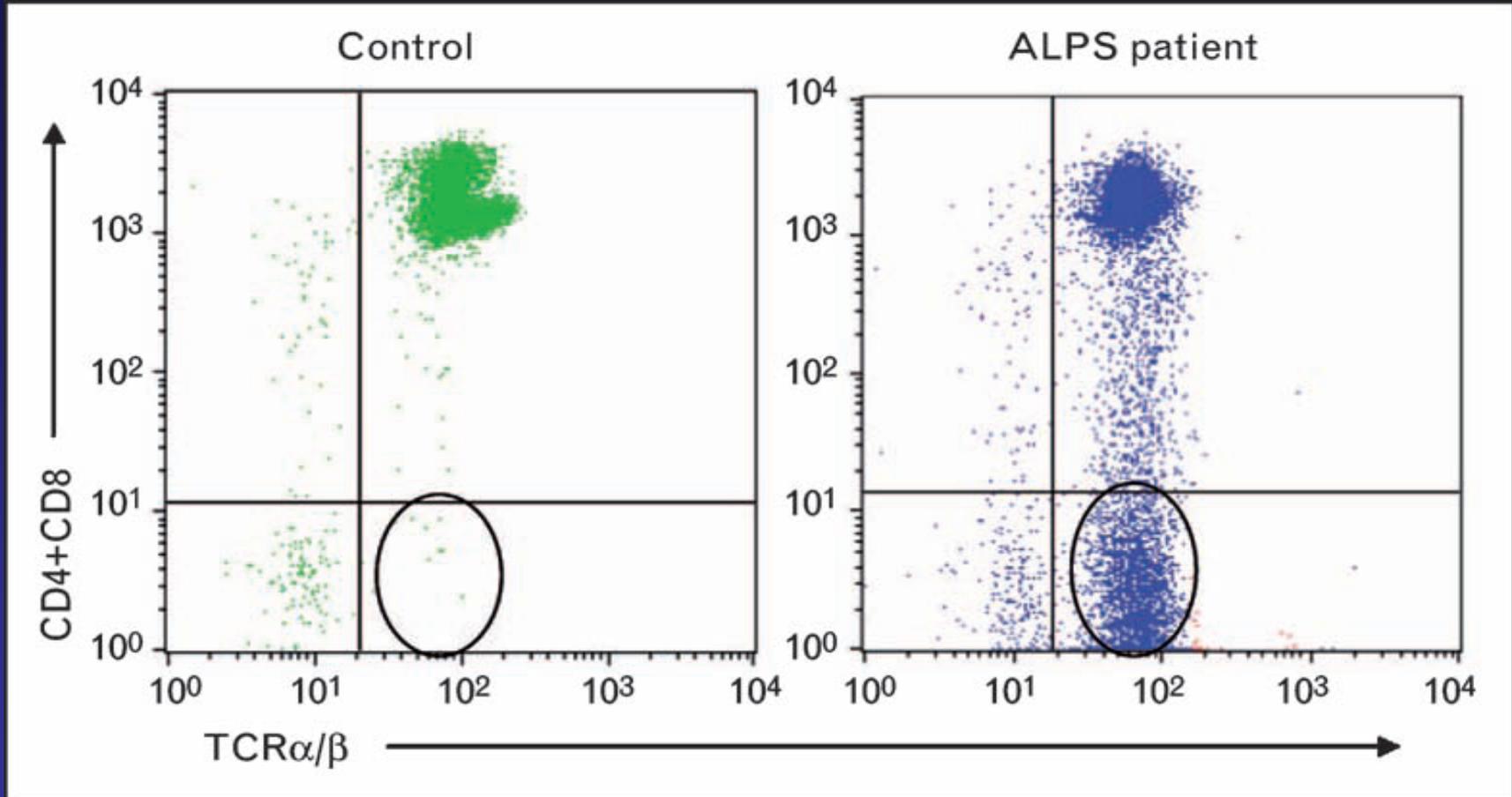
Staining for IFN-gR1 (a) and IL-12R $\beta$ 1 (b) from controls and patients with nonsense mutations in either IFNGR1 or IL-12RB1, respectively.

# CD18 staining of granulocytes



Evaluation of a control and a patient with leukocyte adhesion deficiency type 1 showing marked decrease in CD18 expression (<10% of control expression) and no upregulation in CD18 expression following cell stimulation with PMA. LAD1, leukocyte adhesion deficiency type 1; PMA, phorbol myristate acetate; PMN, polymorphonuclear neutrophil.

# Elevated double-negative T cells in autoimmune lymphoproliferative syndrome patients



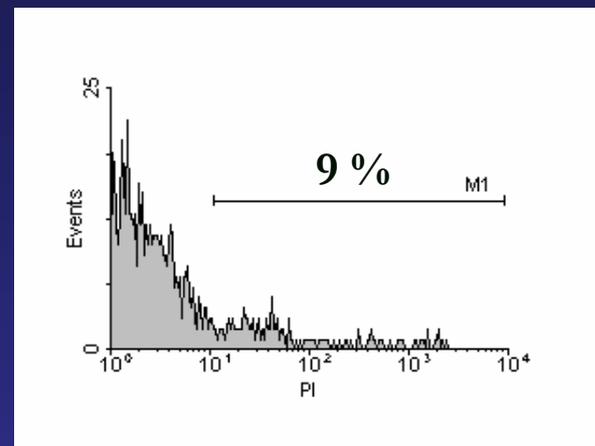
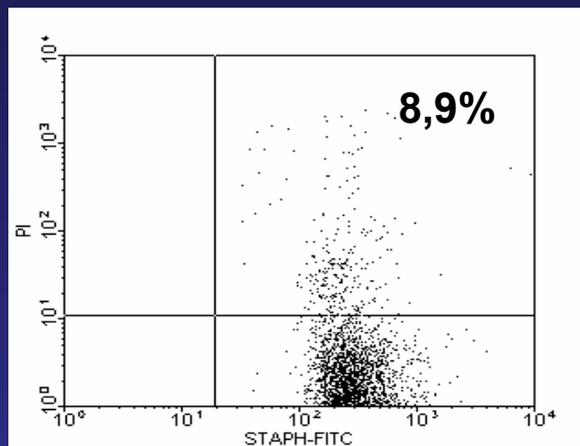
Elevated numbers of CD3+TCR $\alpha/\beta$ +CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> cells in an ALPS patient (right panel) compared with a control individual (left panel). CD3 T cells are evaluated using CD4 and CD8 antibodies conjugated to the same fluorochrome (Y axis) and a monoclonal antibody to a framework component of the  $\alpha/\beta$ TcR (X axis). ALPS, autoimmune lymphoproliferative syndrome.

**Воспалительная гранулема в области  
кожно-плеврального свища у пациента с CGD  
(И.В.Кондратенко и др. 2005).**

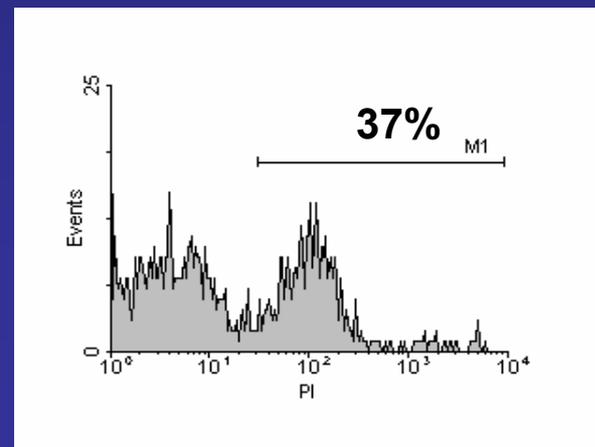
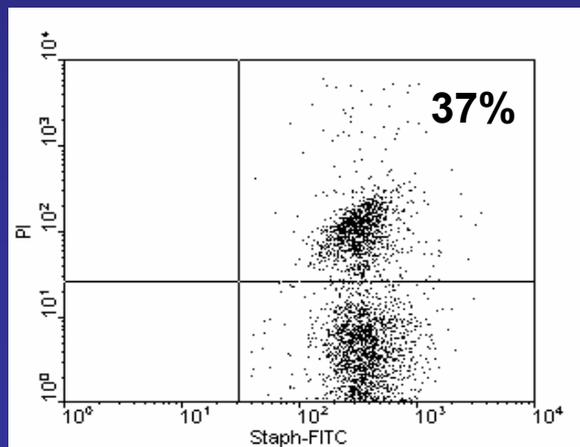


# Бактерицидная активность фагоцитов больного хронической гранулематозной болезнью (Дамбаева С.В. и др., 2001)

## 1. Бактерицидная активность фагоцитов больных ХГБ

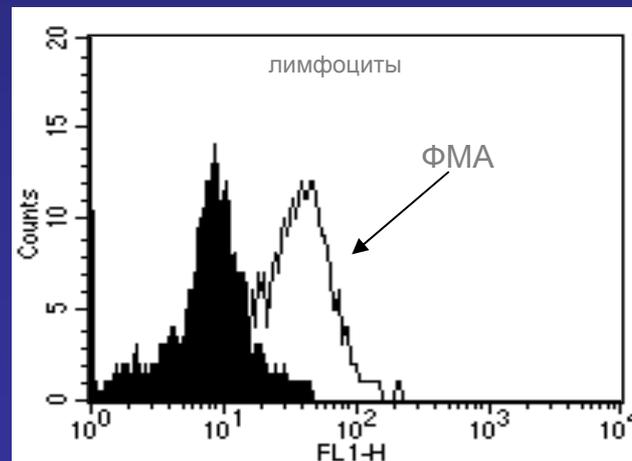
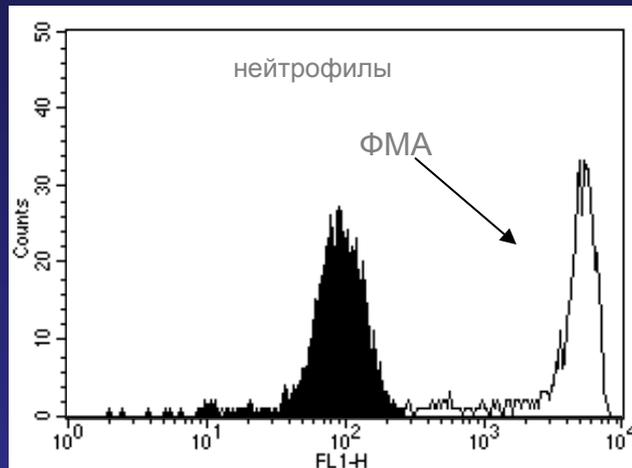


## 2. Бактерицидная активность фагоцитов здорового донора



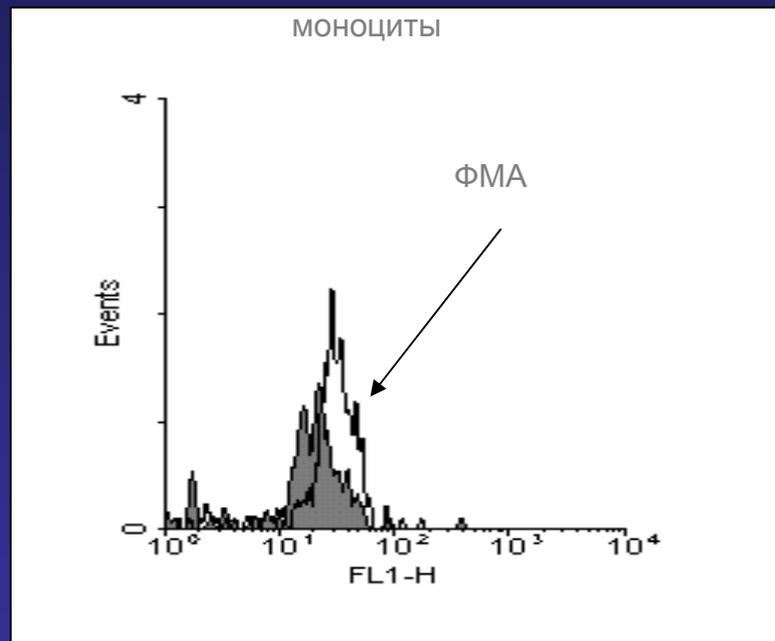
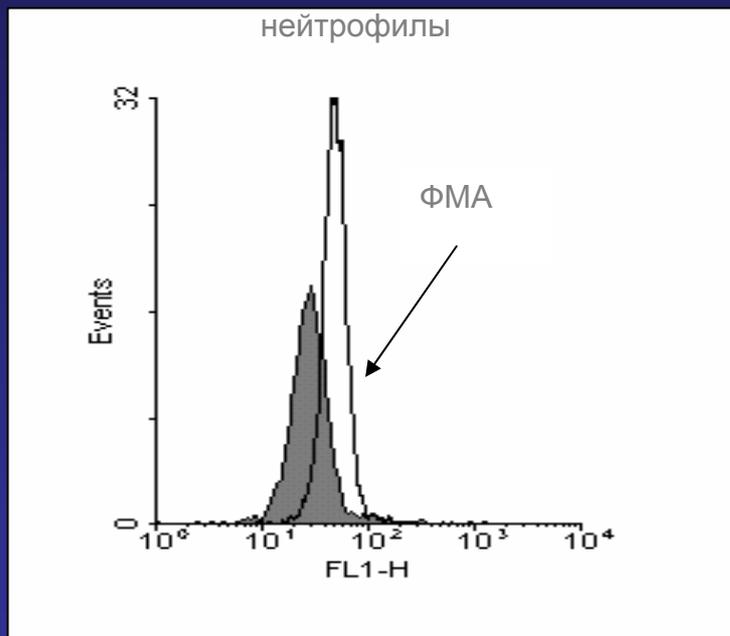
# Гистограммы свечения ДХФ-ДА-меченых лейкоцитов крови доноров.

Все лейкоциты ответили на стимуляцию ФМА.



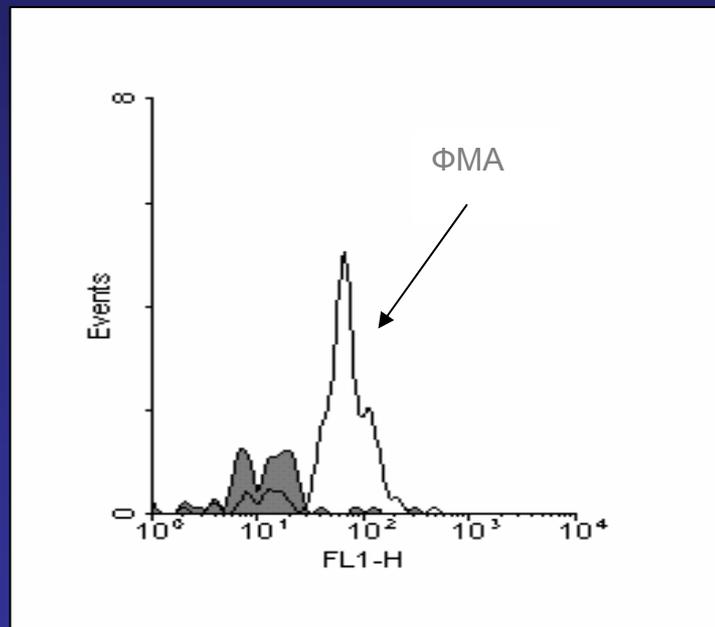
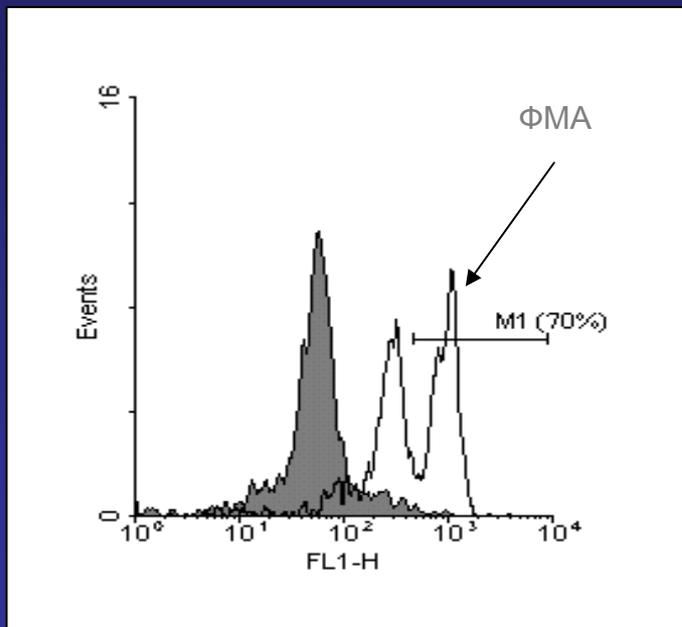
# Гистограммы свечения ДХФ-ДА-меченых лейкоцитов больного ХГБ.

Нейтрофилы не отвечают на стимуляцию ФМА.



# Гистограммы свечения ДХФ-ДА-меченых лейкоцитов матери ребенка при X-цепленной ХГБ (гетерозиготное носительство).

Только 70% нейтрофилов ответили на стимуляцию ФМА.



# **Признаки вторичных иммунодефицитов (Azar A.E., Ballas Z.K. 2007)**

## **Инфекционные признаки:**

- 1. Необычно частые инфекции.**
- 2. Необычная тяжесть инфекций.**
- 3. Необычная продолжительность инфекций.**
- 4. Необычные осложнения.**
- 5. Необычные возбудители.**

## **Неинфекционные признаки:**

- 6. Преждевременная потеря зубов.**
- 7. Необъяснимые бронхоэктазы.**
- 8. Плохое заживление ран.**
- 9. Хроническая диарея или мальабсорпция.**
- 10. Аутоиммунные заболевания.**
- 11. Гематологические расстройства.**
- 12. Плохое самочувствие («failure to thrive”).**

# Основные проявления вторичных иммунодефицитов

**Хронические вялотекущие, рецидивирующие, трудно поддающиеся адекватному этиотропному лечению инфекционно-воспалительные процессы:**

● бронхо-легочного аппарата

● урогенитального тракта

● желудочно-кишечного тракта

● кожи и мягких тканей

● глаз

# **Вторичная иммунологическая недостаточность**

**«Более чем двадцатилетние поиски конкретных поломок в иммунной системе в виде дефицитов или других дефектов компонентов при различных хронических, рецидивирующих, затяжных воспалительных процессах, да и при онкологических и других тяжёлых заболеваниях успехом так и не увенчались».**

***Лебедев К.А., Понякина И.Д. «Иммунная недостаточность». 2003. М. стр. 260***

# Иммунодиагностика нокардиоза ГОЛОВНОГО МОЗГА

Больной К., 54 лет, поступил в НИИ нейрохирургии им.Н.Н.Бурденко с явлениями левостороннего гемипареза, центрального пареза лицевой мускулатуры, с жалобами на постоянные головные боли, изменение походки, снижение силы в руках и ногах.

С помощью МРТ установлено наличие объемного образования в затылочной доле головного мозга.

При краниотомии затылочной области был обнаружен абсцесс, который был удалён. По ходу операции было обнаружено и удалено ещё 10 абсцессов.

ИЗ СОДЕРЖИМОГО АБСЦЕССА ВЫДЕЛЕНА КУЛЬТУРА  
*Nocardia brasiliensis*

# Иммунодиагностика нокардиоза головного мозга

При изучение фагоцитоза,  
уровня иммуноглобулинов и комплемента,  
функциональной активности Т- и В-лимфоцитов,  
субпопуляционного состава лимфоцитов,  
интерферонового статуса

существенных нарушений у больного К. не  
обнаружено.

# Синтез ИФН- $\gamma$ мононуклеарами больного К. (пкг/мл)

	Спонтанная	ФГА	Нокардии
Доноры	<b>0-10</b>	<b>100-1000</b>	<b>100-1000</b>
Больной К.	<b>0</b>	<b>1491</b>	<b>0</b>

## **Изменения (причинные) клеточного иммунитета при кандидозе:**

**У мононуклеаров периферической крови больных с кандидозом влагалища отсутствует или резко снижена способность синтезировать интерферон-гамма при активации антигенами Candida.**

*(Carvalho et al. 2002)*

# **Возможные причины вторичных иммунодефицитов :**

**1. Наличие «малых» нарушений в нескольких звеньях иммунной системы, ведущих при определённых обстоятельствах к повышенной заболеваемости.**

**2. Наличие первичного скрытого дефекта в каком-то одном из звеньев иммунной системы, компенсированного до определённого времени за счёт высокой функциональной активности других компонентов и проявляющегося во взрослом состоянии в связи со старением иммунной системы и воздействия на неё ряда неблагоприятных факторов.**

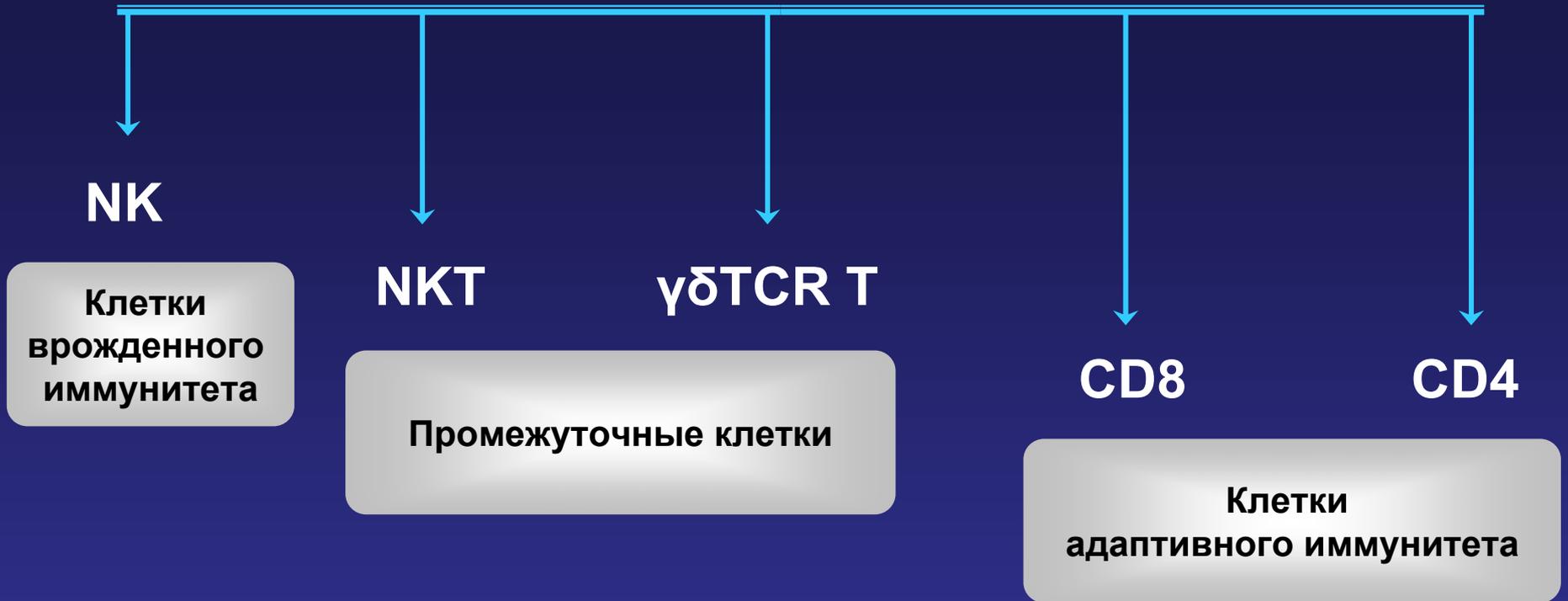
# **ИССЛЕДОВАНИЕ АДАПТИВНОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА:**

- 1. Определение пролиферации и синтеза цитокинов под влиянием специфических антигенов.**
- 2. Реакция торможения миграции лейкоцитов**
- 3. Определение цитолитических CD8+ Т-клеток с помощью реакции специфической дегрануляции.**
- 4. Определение реакции Т-клеток на антигены МНС в смешанной культуре лейкоцитов (СКЛ).**
- 5. Метод определения цитолитической активности цитотоксических Т-лимфоцитов.**
- 6. Метод оценки секреторной активности клеток путем определения иммуноферментных пятен – ELISPOT (enzyme-linked immunospot).**
- 7. Определение антигенспецифических Т-лимфоцитов с использованием МНС-пептидных тетрамеров.**

# Применение углубленных тестов.

1. Обоснованность.
2. Стандартизация.
3. Интерпретация.
4. Возможности лаборатории.
5. Возможности транспортировки.

# Цитотоксические лимфоциты

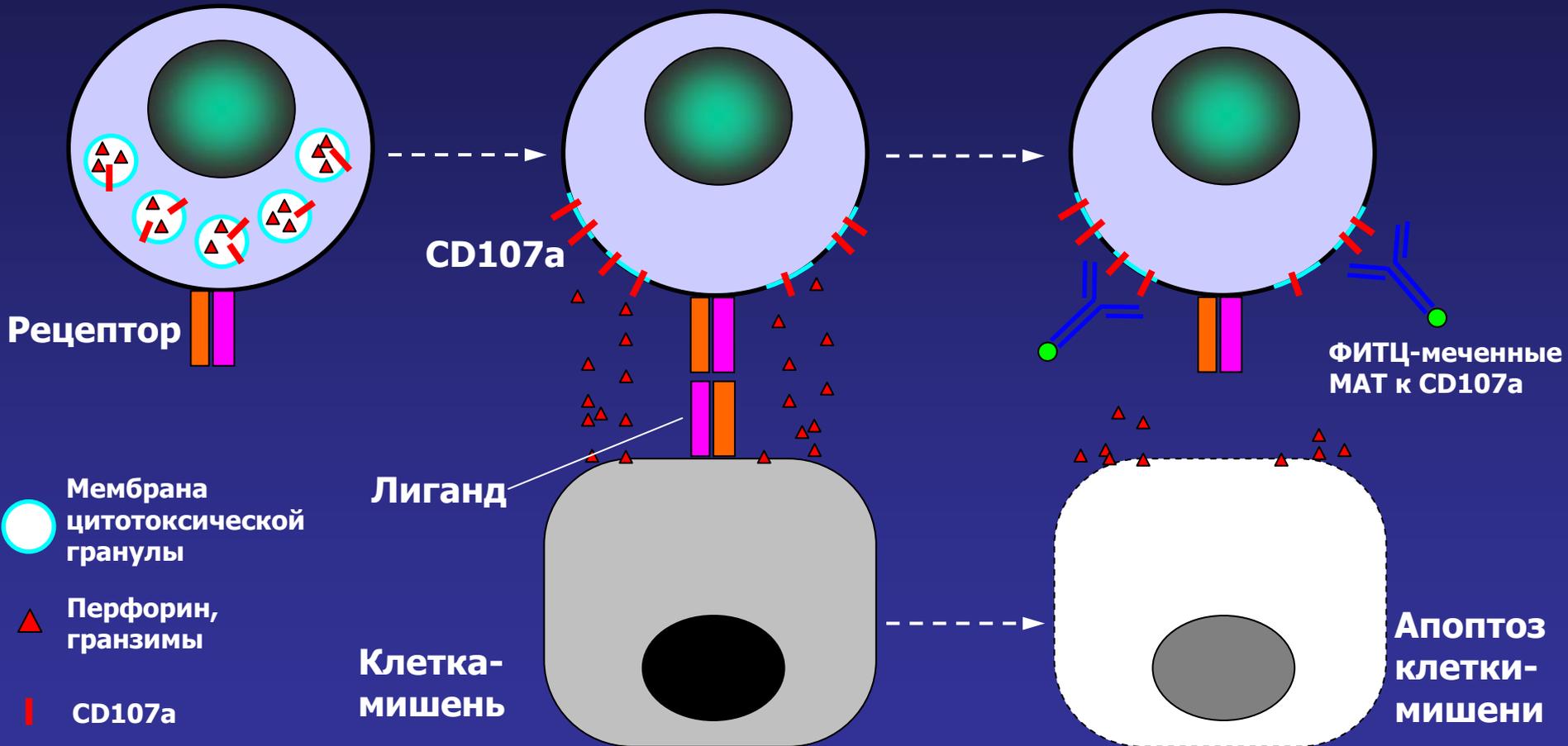


## Механизм действия

- Перфорин-гранзим – опосредованная цитотоксичность
- Цитотоксичность, опосредованная FASL, TRAIL, фосфолипидами
- Индукция апоптоза инфицированных клеток

# Принцип реакции дегрануляции лимфоцитов

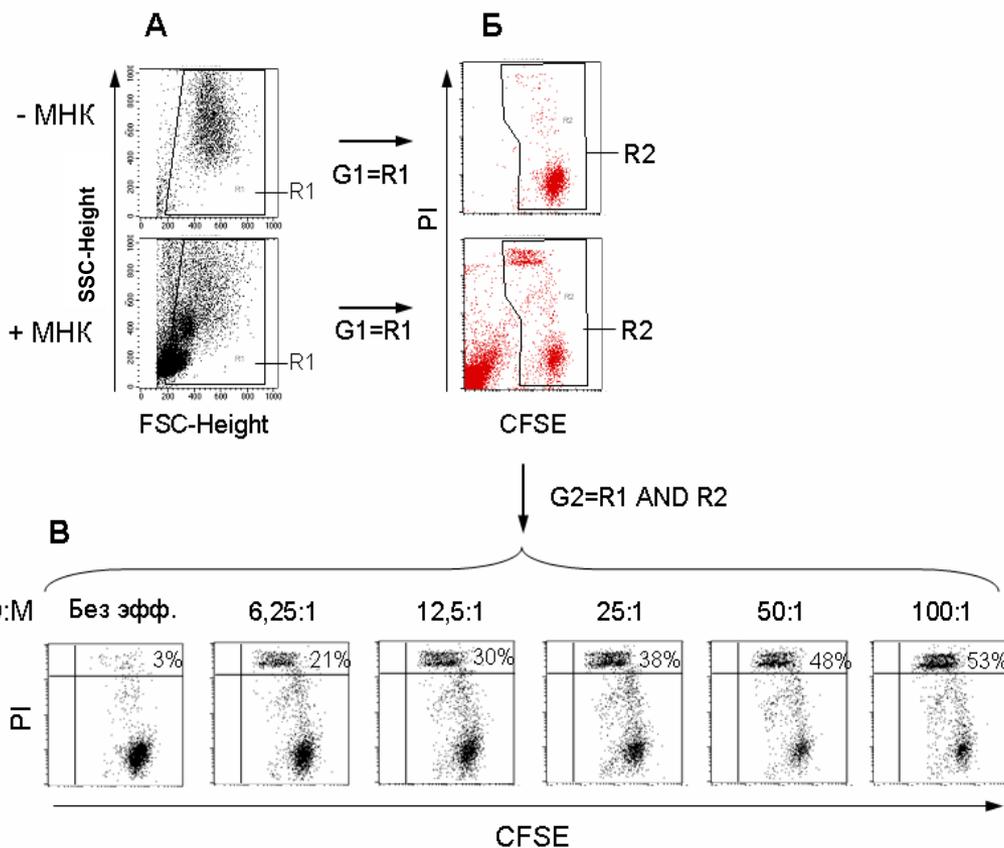
CD8<sup>+</sup> Т-клетка  
или NK-клетка



**НК-клетки – это NKp46+CD3-, IL-15-зависимые,  
IL-12 – индуцируемые лимфоциты,  
синтезирующие IFN $\gamma$  и быстро развивающие  
цитотоксичность по отношению к клеткам, не  
имеющим молекул MHC-I.**

***T.Walzer et al, 2007.***

# Метод оценки НК-клеток



А — строят график FSC против SSC, на котором с помощью региона R1 отделяют клетки от дебриса.

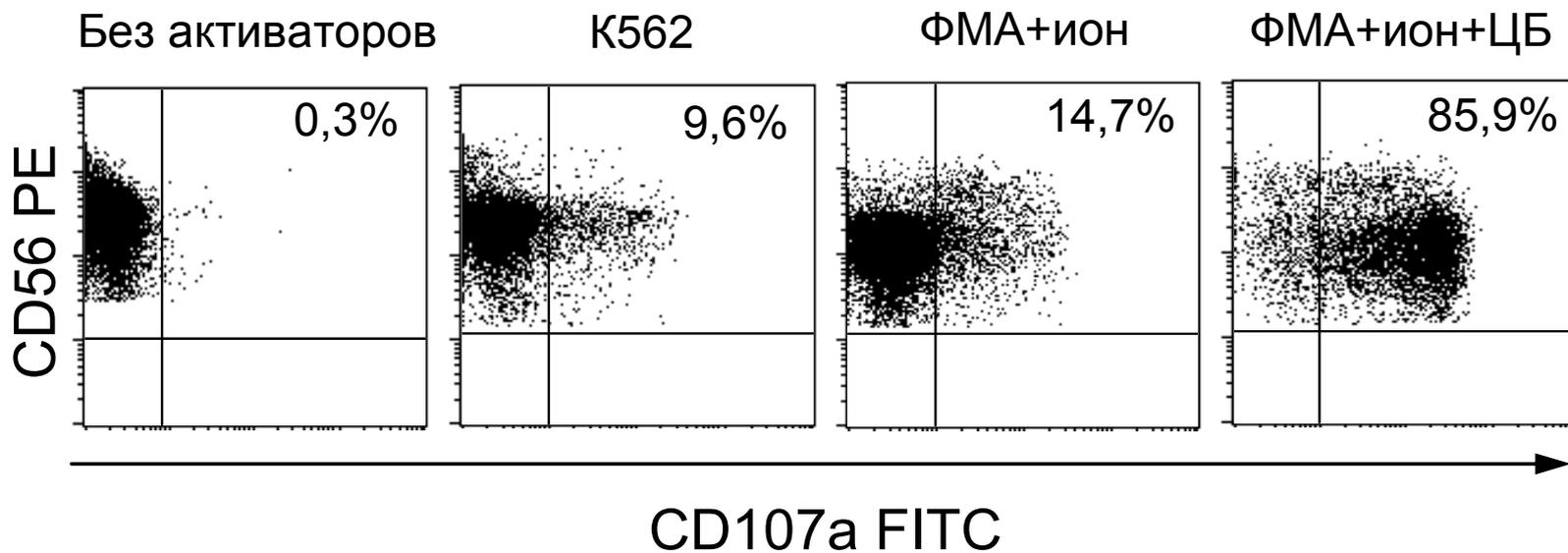
Б — используя G1=R1, строят график КФСЭ (FL-1) против PI (FL-3), на котором с помощью региона R2 отделяют КФСЭ + события (КФСЭ - меченные клетки K-562) от КФСЭ - событий (немеченные эффекторы).

В — используя G2 = R1 AND R2, строят графики CFSE против PI. С помощью квадрантного маркера отделяют КФСЭ +ПИ++ события (убитые мишени) от остальных мишеней.

Соотношение Э:М	6,25:1	12,5:1	25:1	50:1	100:1
% киллинга	15±13,9	25,2±14,9	35,9±17,7	42±13,9	48,7±11

# Цитометрическая картина дегрануляции NK-клеток здорового донора

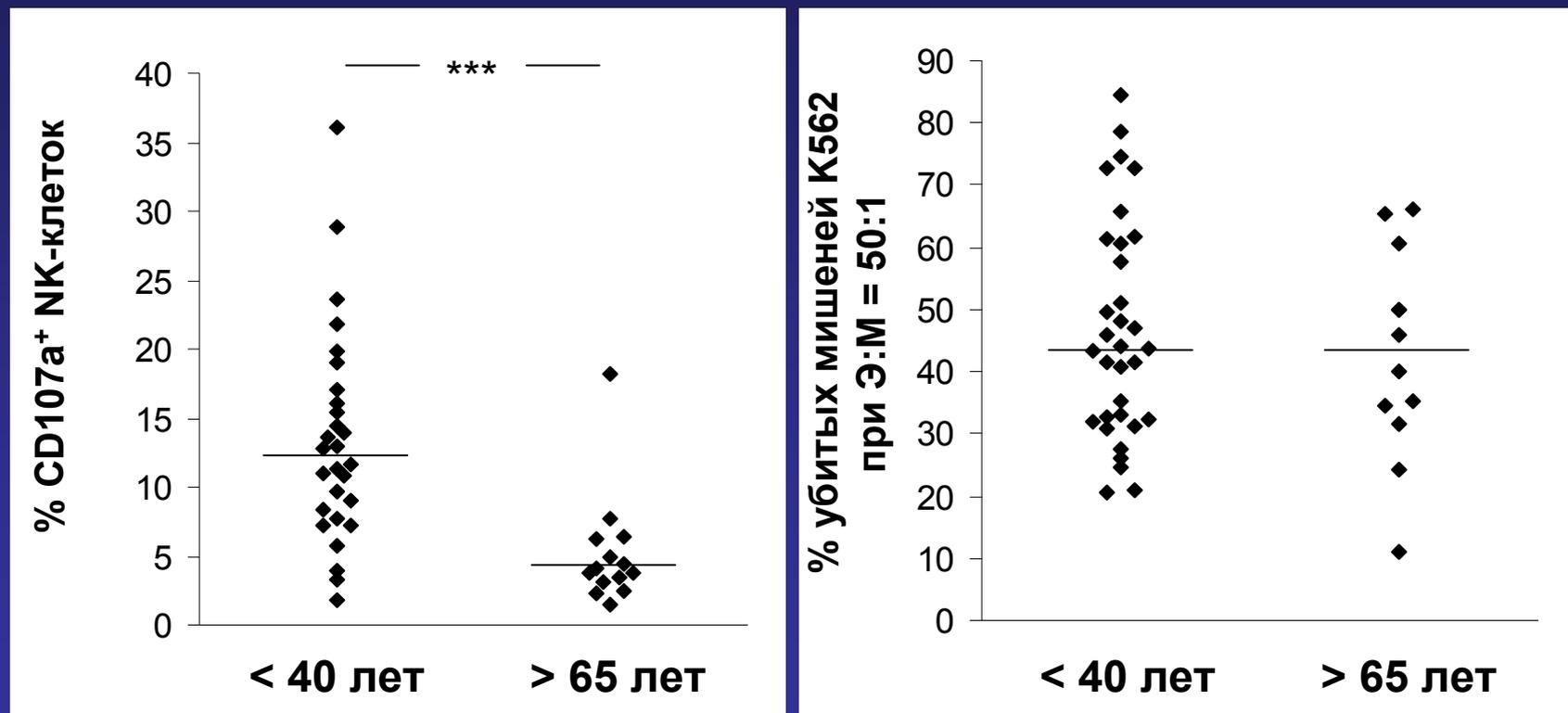
## CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK-клетки



# Функциональные показатели НК-клеток у пожилых и молодых здоровых доноров (Муругин ВВ и др.2009)

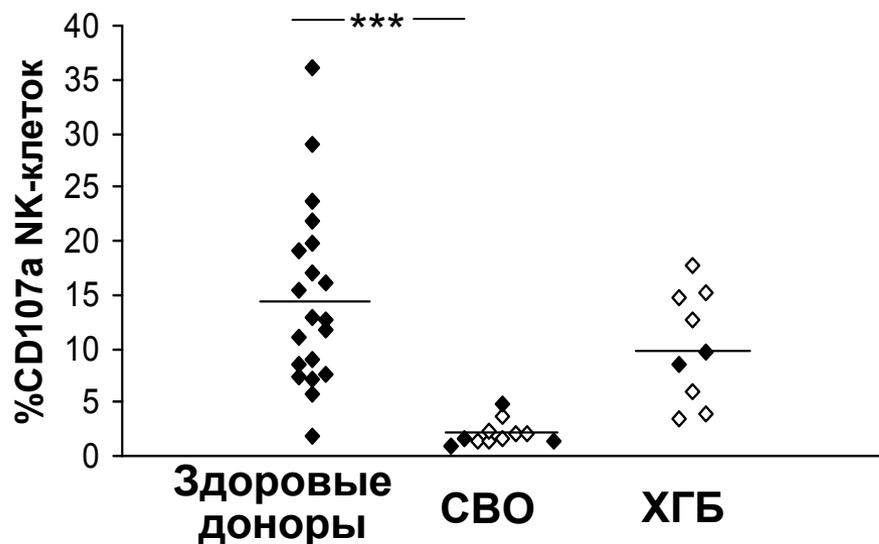
Дегрануляция при стимуляции клетками K562

НК-активность

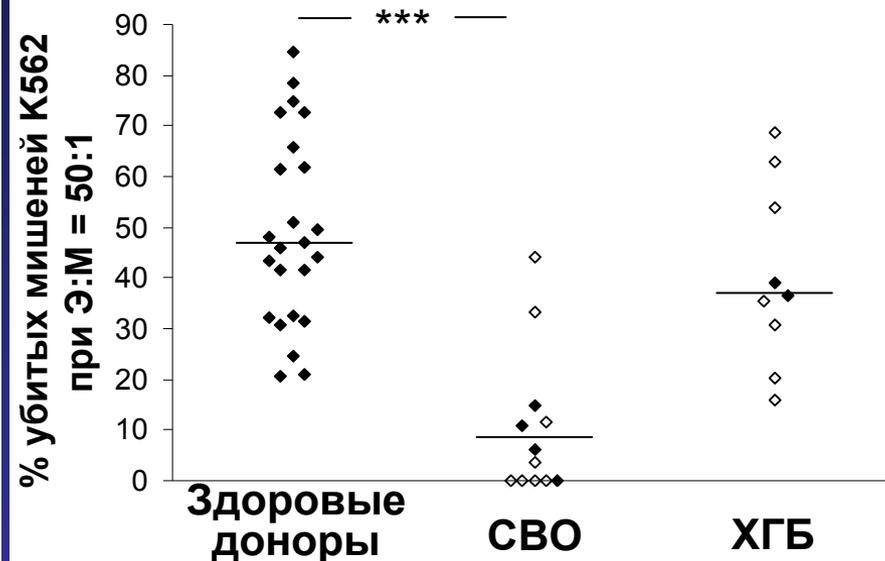


# Функциональные показатели НК-клеток при первичных иммунодефицитах (Муругин ВВ и др.2009)

Дегрануляция при стимуляции клетками K562



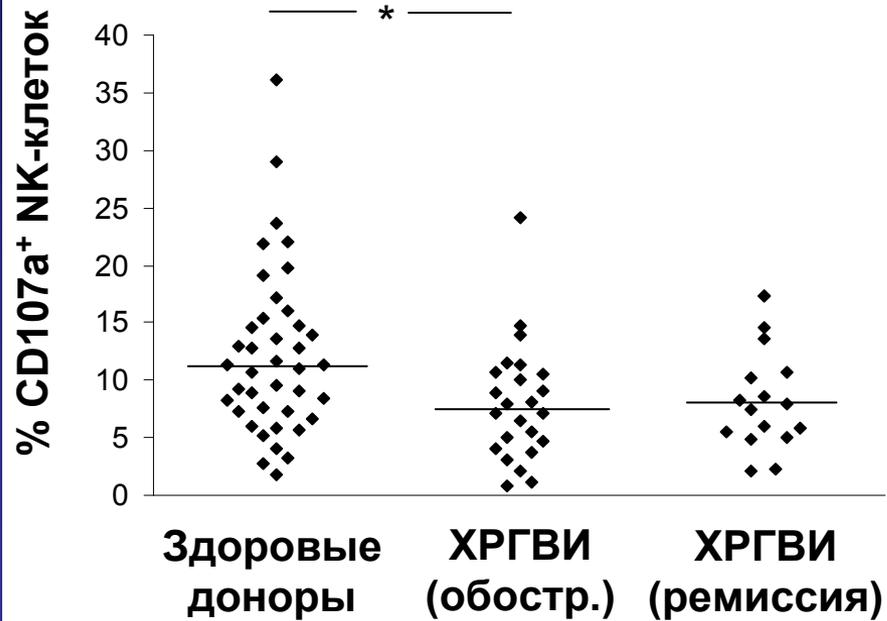
НК-активность



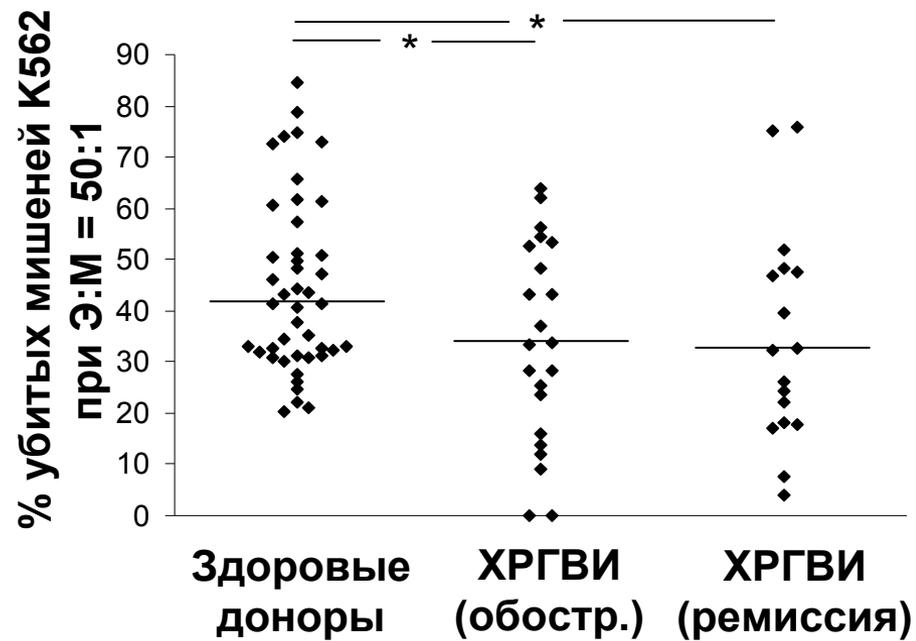
- ◇ Пациенты, получавшие антимикробную или иммуносупрессивную терапию
- ◆ Пациенты, не получавшие терапию на момент исследования

# Функциональные показатели НК-клеток при ХРГВИ (Муругин ВВ и др.2009)

Дегрануляция при  
стимуляции клетками K562



НК-активность



## Функциональные показатели НК-клеток при различных состояниях и нозологических формах

	% НК-клеток	НК-активность	Дегрануляция		CD107a внутрикл.	Перфорин внутрикл.
			K562	ФМА+ион+ЦБ		
Пожилой возраст	N	N	↓	↓	N	N
ХРГВИ	N	↓	↓	↓	N	N
СВО	N↓	↓↓	↓↓	↓↓	N	N
ХГБ	N↓	N	N	N	Не иссл.	Не иссл.

← **CD3+CD8+ - клетки** →



экстернализация CD107a (LAMP-1)

перфорин

(Пашенков МВ и др. 2009)

← **CD3+CD8+ - клетки** →

← **эффекторные  
клетки памяти** →

CD45RA-CCR7-

CD45RA+CCR7-

CD57-

CD57+

CD57-

CD57+

CD107a

CD107a

перфорин

перфорин

(Пашенков МВ и др. 2009)