

**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-розеткообразования 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.В.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_2

Комплемент

гемолитическая активность

**Иммуно-
глобулины**

IgG, IgA, IgM, IgE

**Субпопуляции
лимфоцитов**

CD3, CD4, CD8, CD19

Основные виды первичных иммунодефицитов:

- Х-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 δ ниже нормального;
- отсутствие изогемагглютининов.

Оценка иммунного статуса с помощью проточной цитометрии (ПЦ)



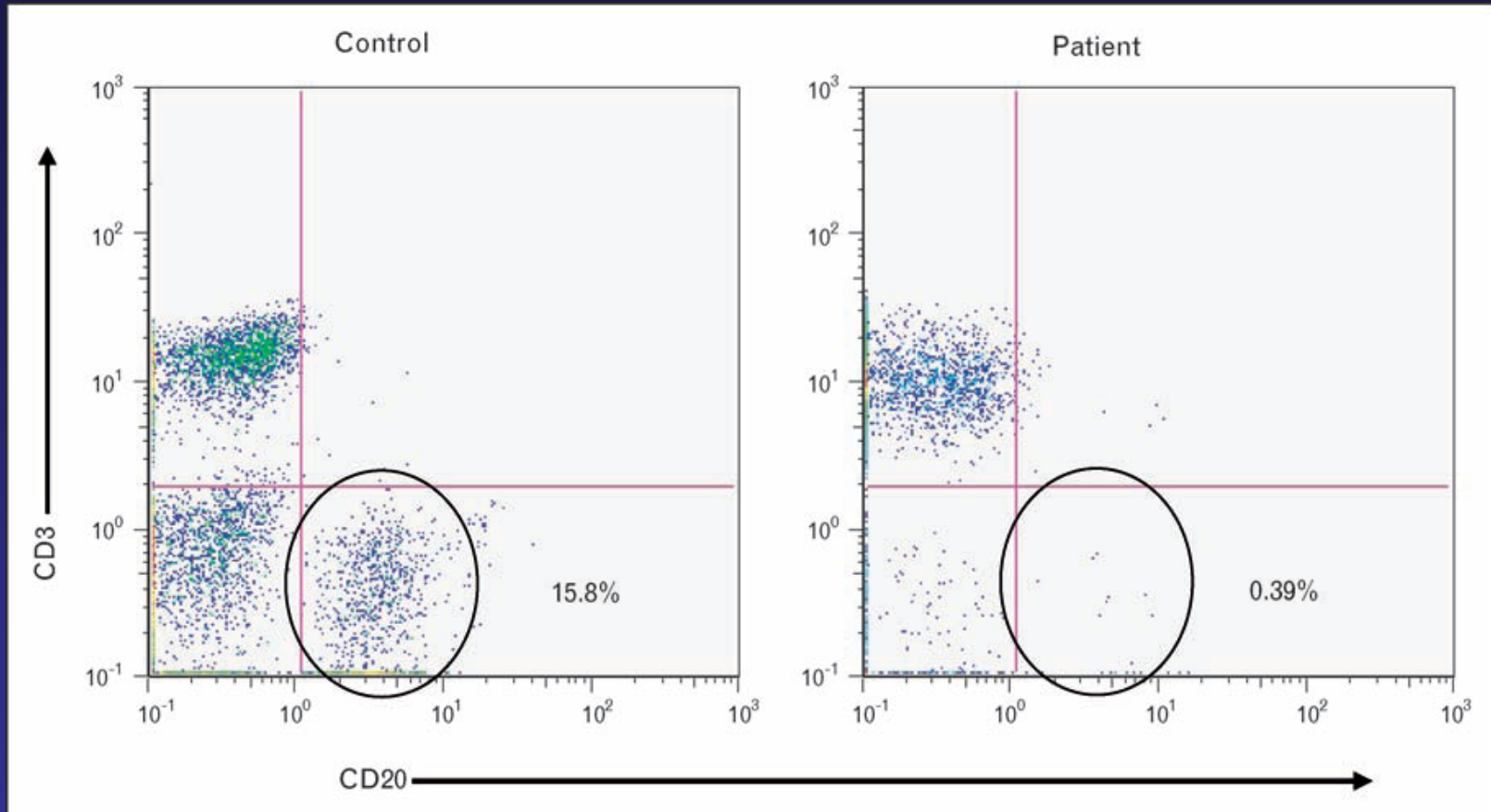
1. Применение проточной цитометрии в диагностике

№	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

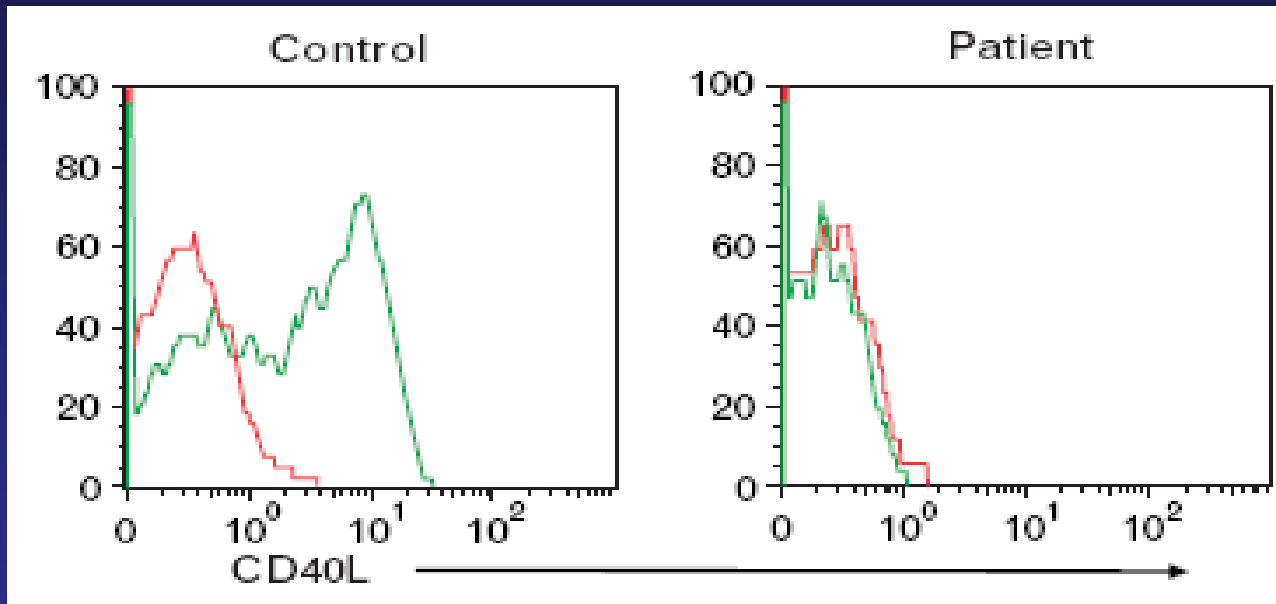
№	Заболевание	Параметр	Клиника
7.	Дефекты пути IL-12/23-IFN γ	IFN γ R1 (CD119) IL-12R β 1 (CD212) STAT1	Инфекции , вызванные апатогенными микобактериями и сальмонеллами
8.	IPEX-синдром	Транскрипционный фактор FOXP3 CD4 CD25	X-сцепленный иммунодефицит, полиэндокринопатия, энтеропатия, экзематозный дерматит
9.	Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS)	FASR (CD95) FASL (CD178) α/β 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



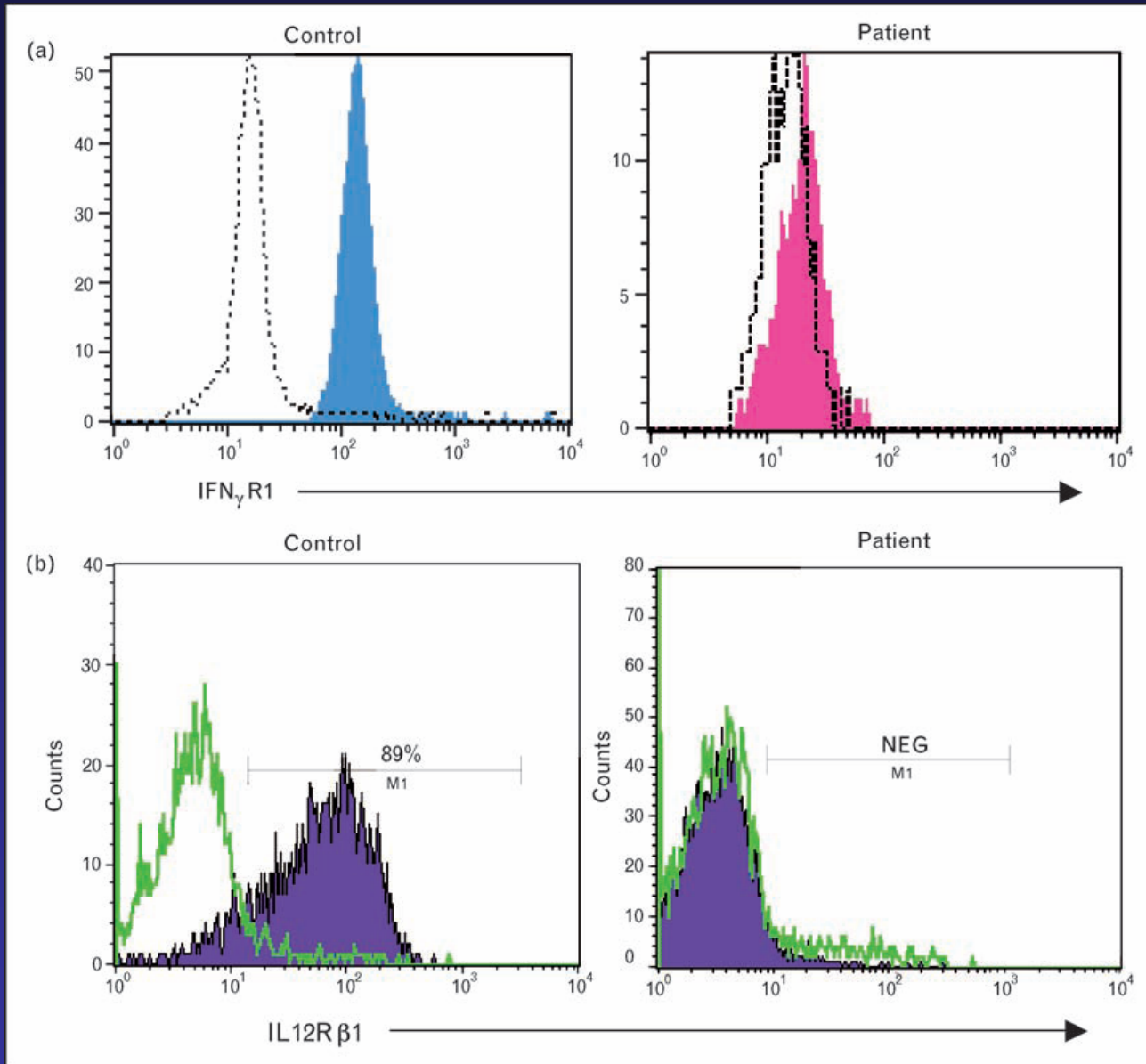
CD3 and CD20 two color staining of lymphocytes from a control and a patient with XLA. The patient demonstrates virtual absence of B cells (CD20+CD3-) but normal T cells (CD3+CD20-). XLA, X-linked agammaglobulinemia.

X-linked hyper immunoglobulin M syndrome



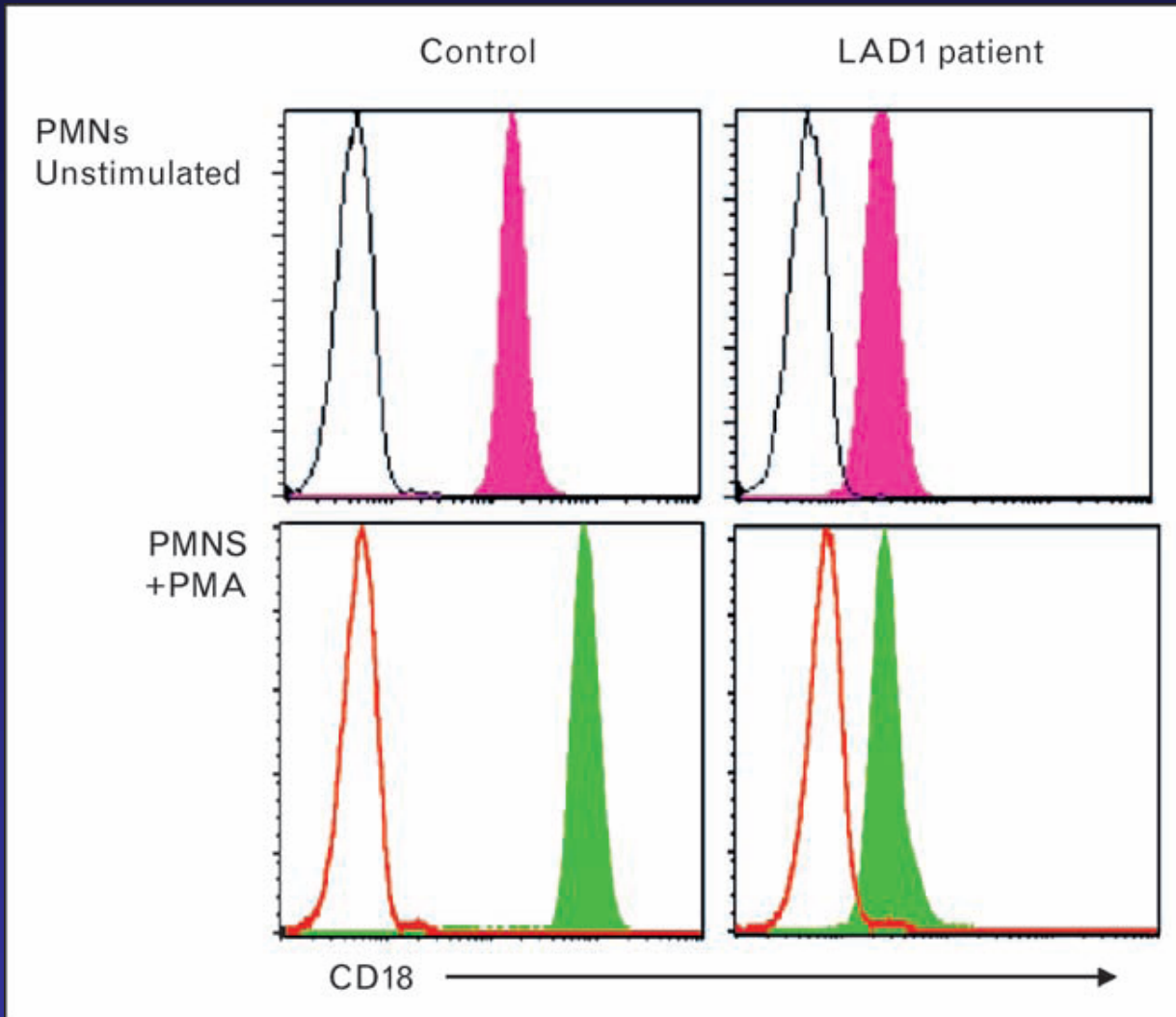
Absent CD40L (CD154) expression on the surface of activated CD4⁺ T cells of a HIGM1 patient, as compared with a control using PBMCs activated by PMA and ionomycin. ■, T-cell activation; ■, baseline. HIGM, hyper immunoglobulin M syndrome; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PMA, phorbol myristate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

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



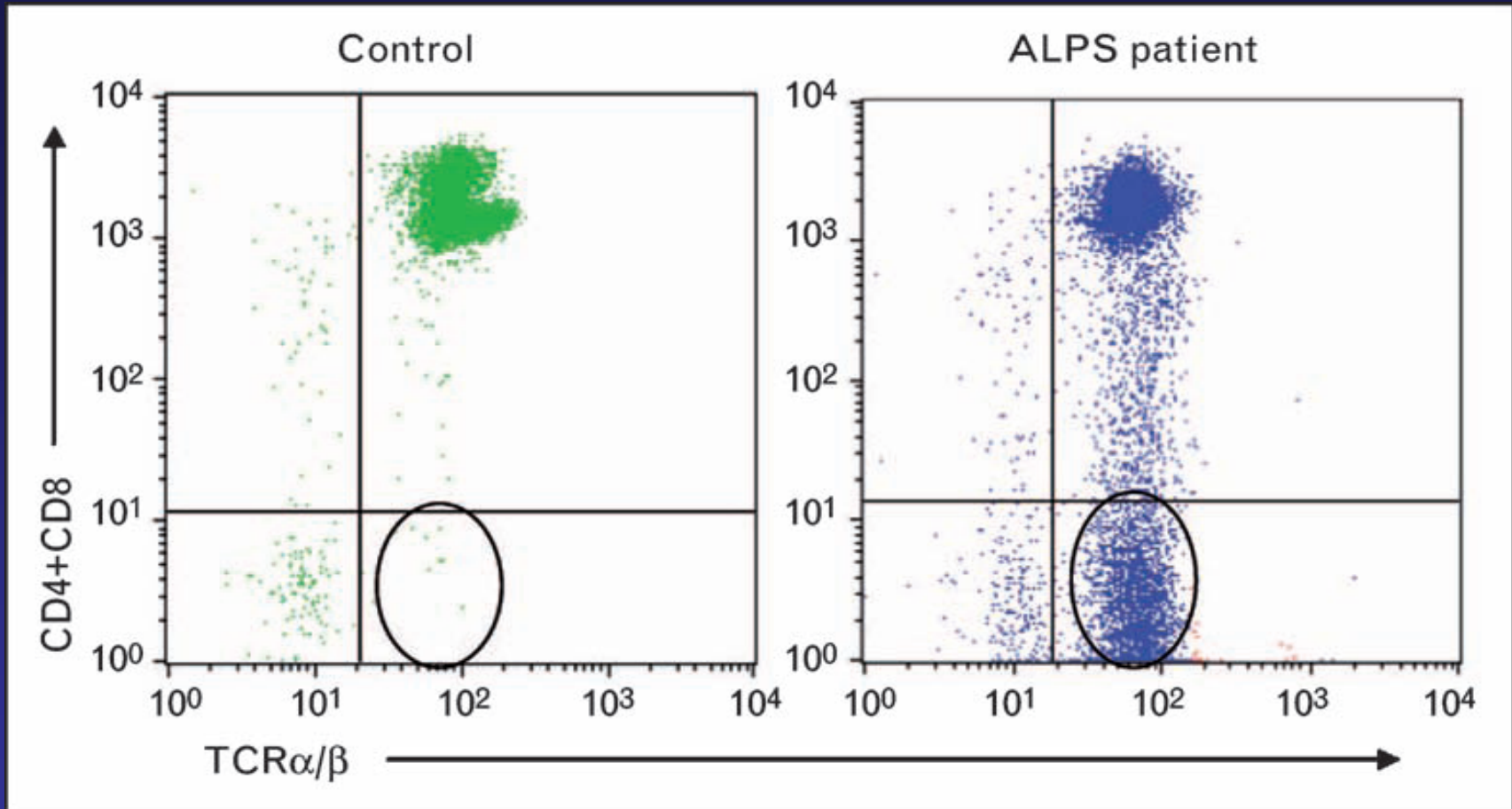
Staining for IFN-gR1 (a) and IL-12Rb1 (b) from controls and patients with nonsense mutations in either IFNGR1 or IL-12RB1, respectively.

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



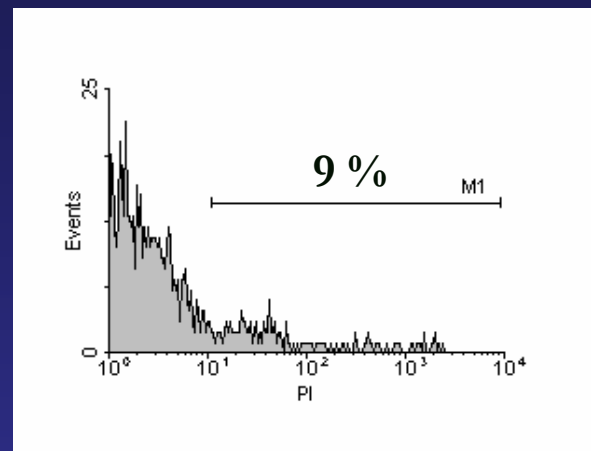
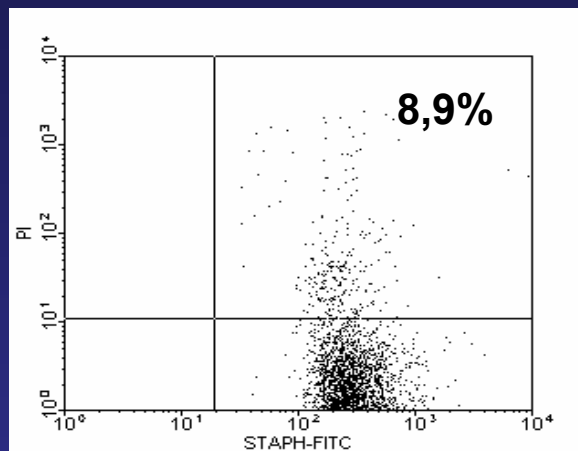
Elevated numbers of CD3+TCR α/β +CD4-CD8- cells in an ALPS patient (right panel) compared with a control individual (left panel). CD3 T cells are evaluated using CD4 and CD8 antibodies conjugated to the same fluorochrome (Y axis) and a monoclonal antibody to a framework component of the α/β TcR (X axis).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

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

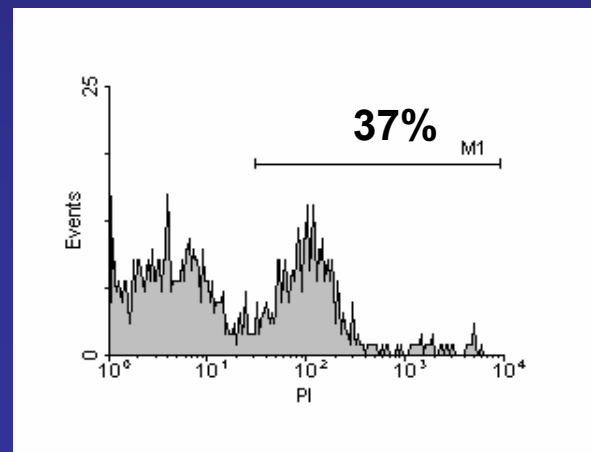
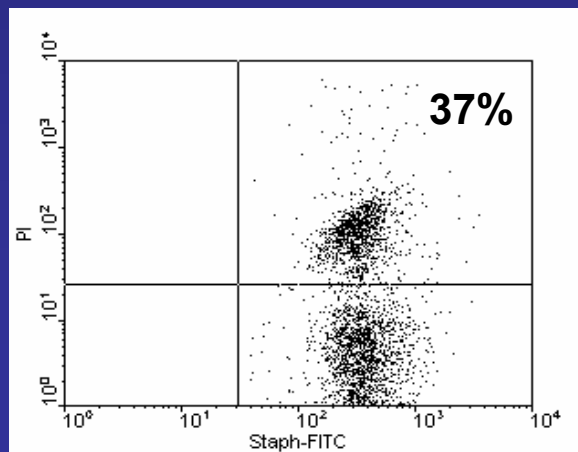


Бактерицидная активность фагоцитов больного хронической гранулематозной болезнью (Дамбаева С.В. и др., 2001)

1. Бактерицидная активность фагоцитов больных ХГБ

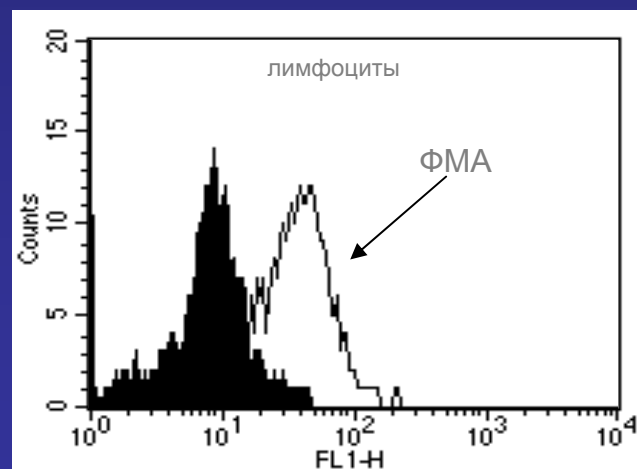
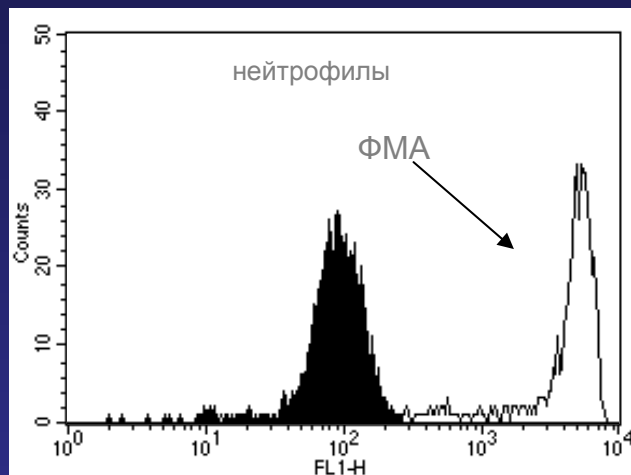


2. Бактерицидная активность фагоцитов здорового донора



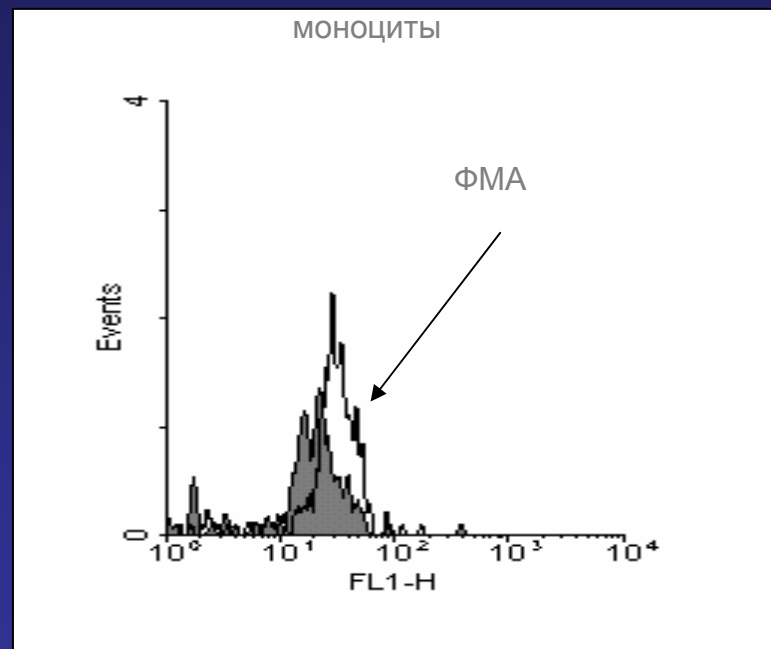
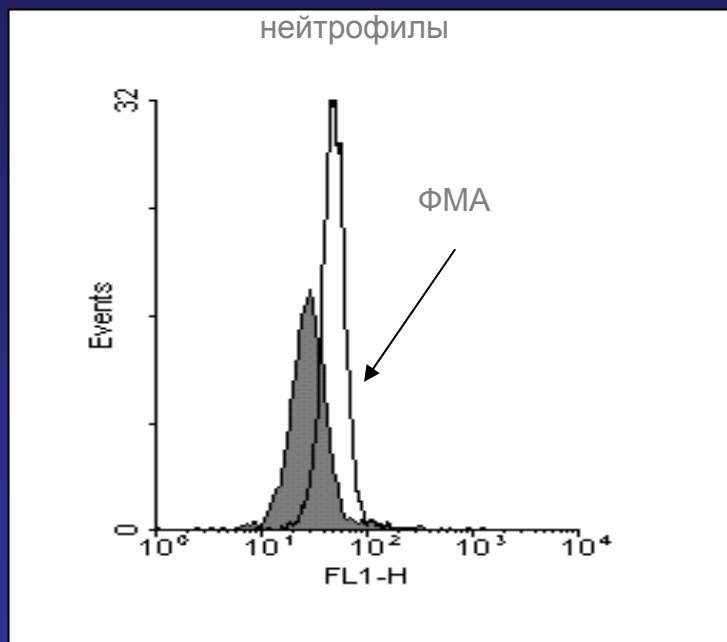
Гистограммы свечения ДХФ-ДА-меченых лейкоцитов крови доноров.

Все лейкоциты ответили на стимуляцию ФМА.



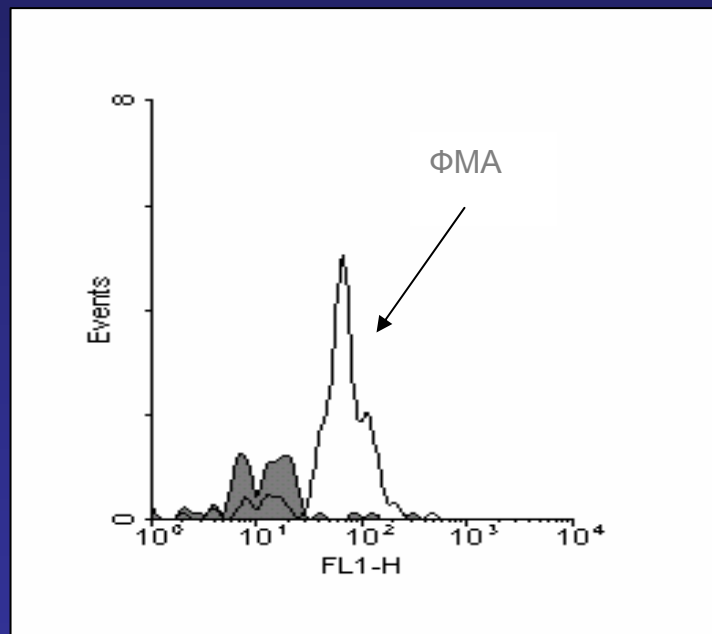
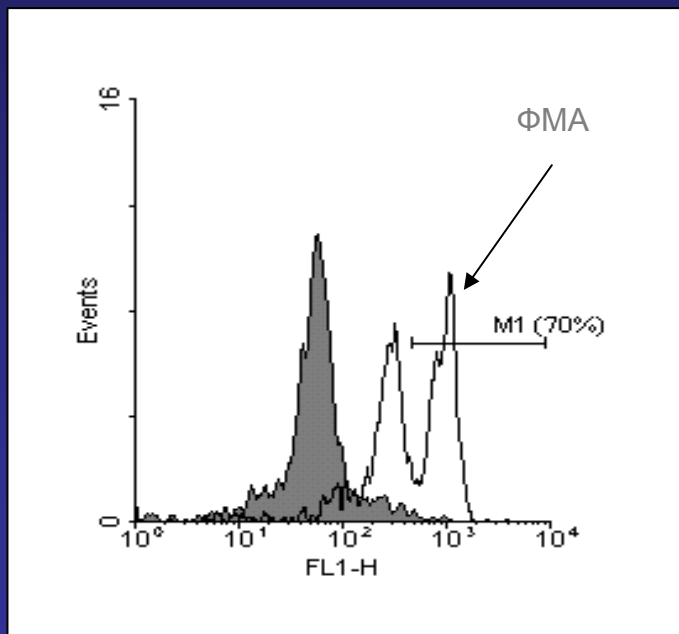
Гистограммы свечения ДХФ-ДА-меченых лейкоцитов больного ХГБ.

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-γ мононуклеарами больного К. (пкг/мл)

	Спонтанная	ФГА	Нокардии
Доноры	0-10	100-1000	100-1000
Больной К.	0	1491	0

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.

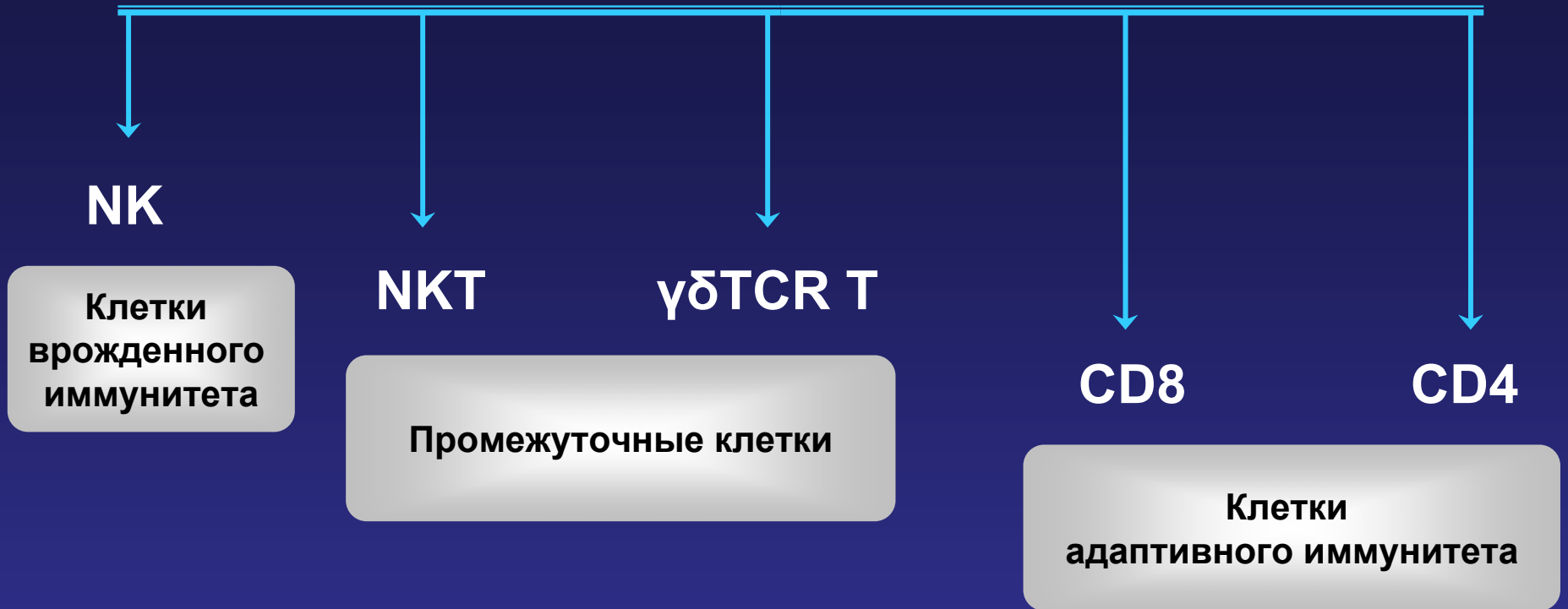
ИССЛЕДОВАНИЕ АДАПТИВНОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА:

- 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

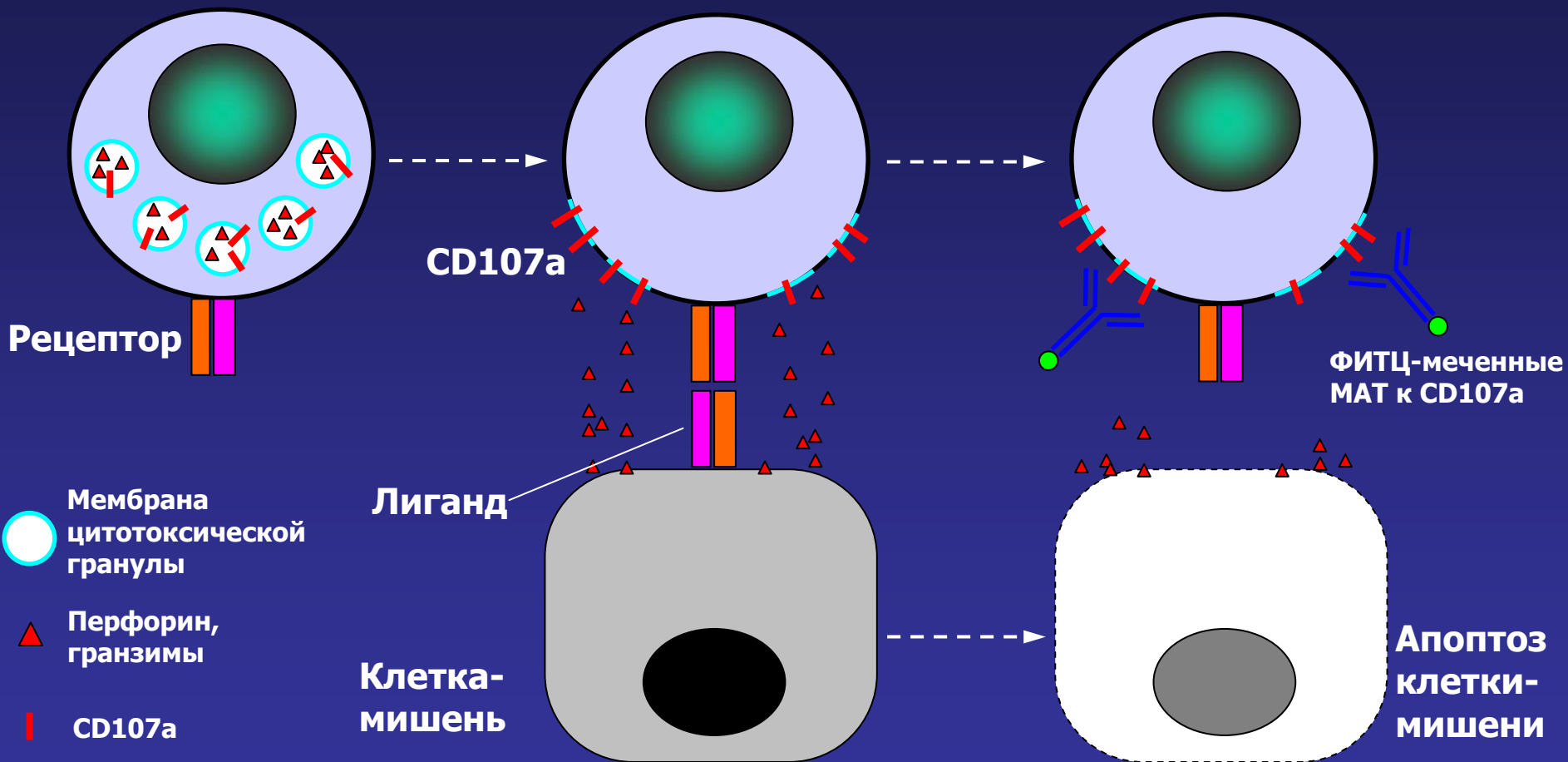


Механизм действия

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

Принцип реакции дегрануляции лимфоцитов

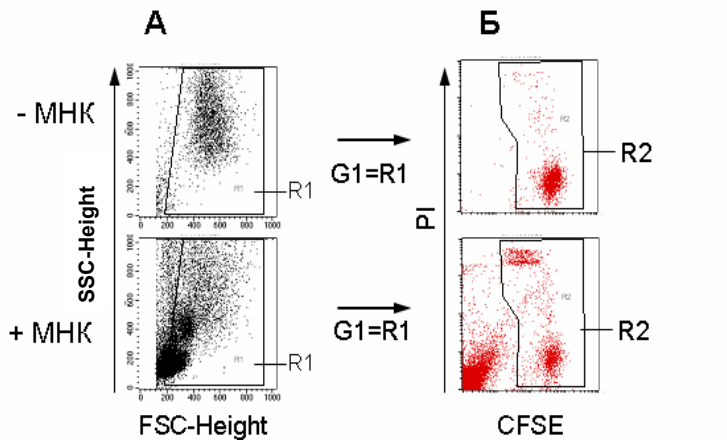
CD8⁺ Т-клетка
или NK-клетка



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

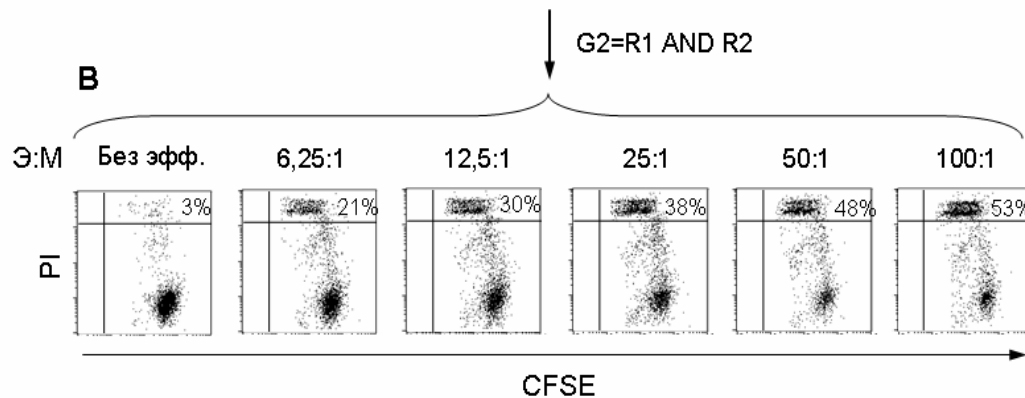
T.Walzer et al, 2007.

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).

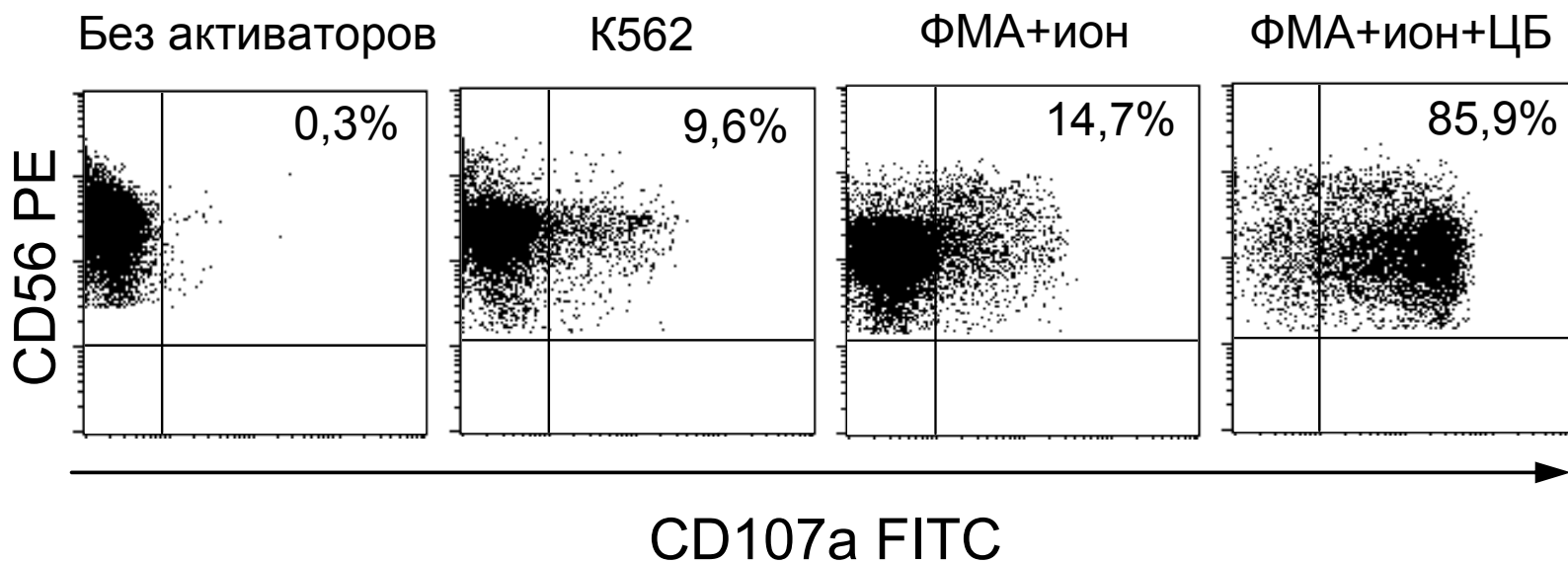


В — используя G2 = R1 AND R2, строят графики CFSE против PI. С помощью квадрантного маркера отделяют КФСЭ +PI++ события (убитые мишени) от остальных мишеней.

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

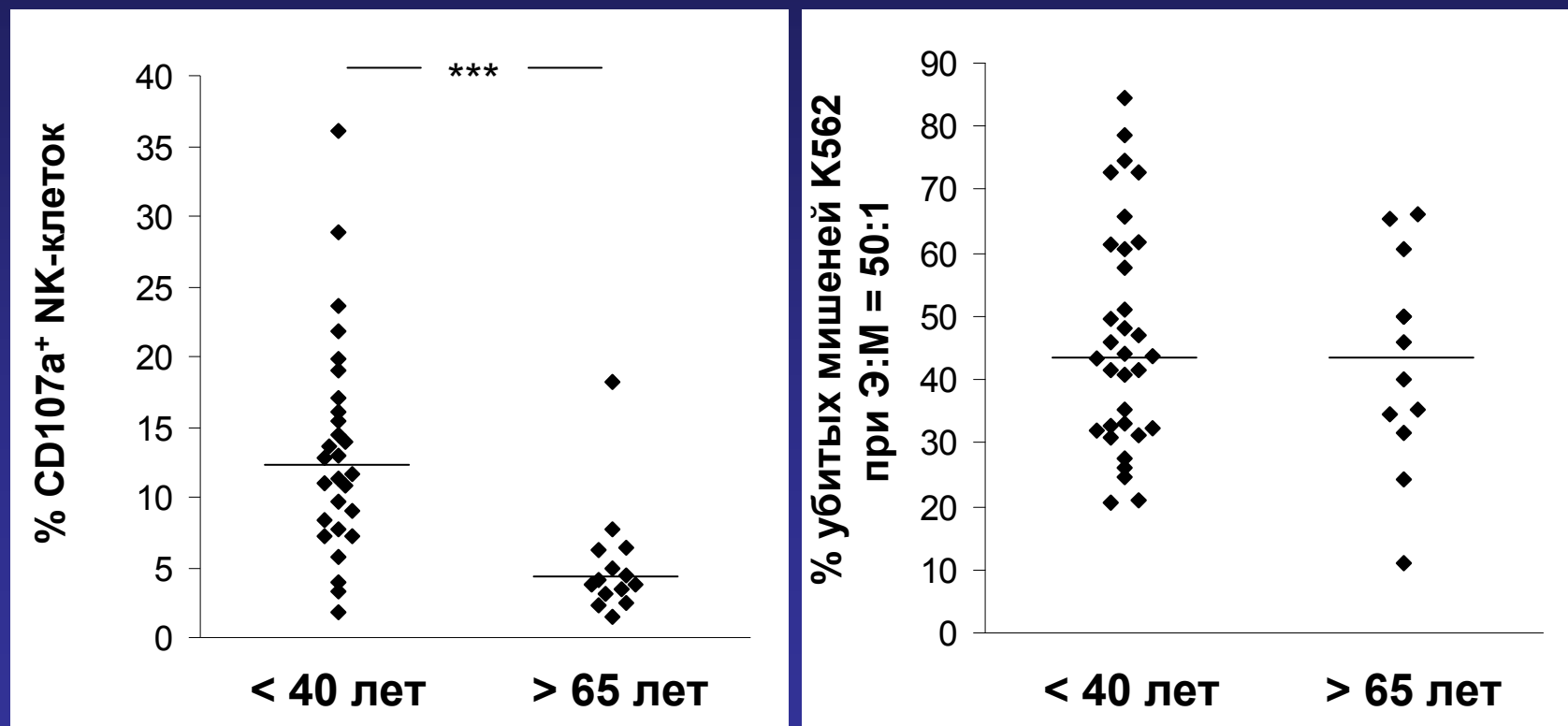
CD3⁻CD56⁺ NK-клетки



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

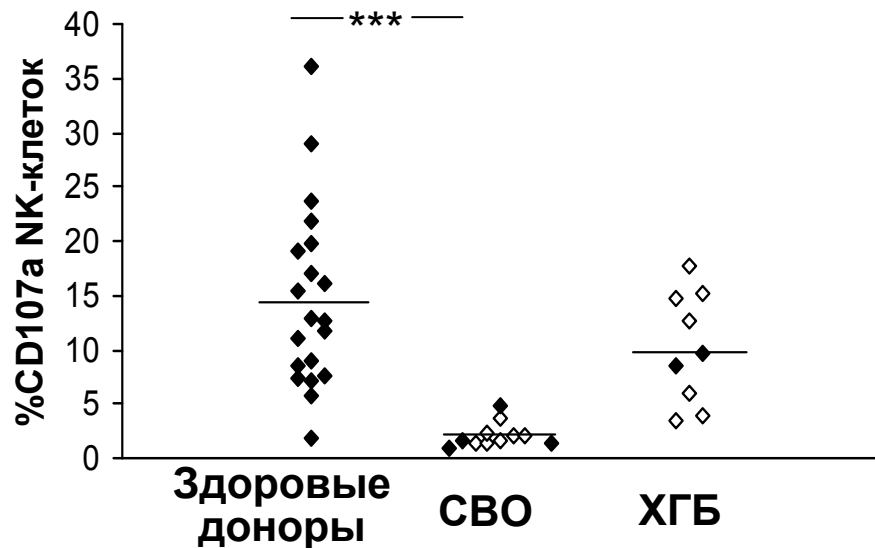
Дегрануляция при стимуляции клетками K562

НК-активность

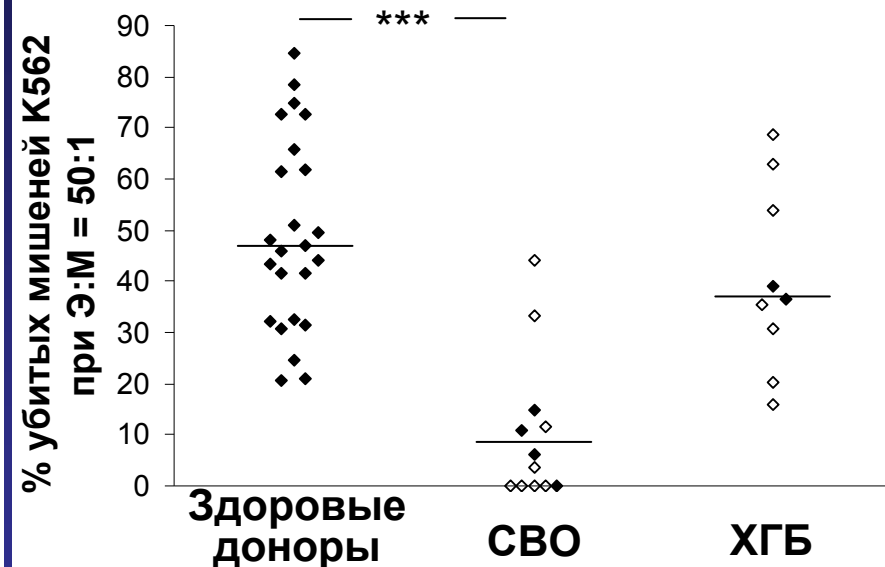


Функциональные показатели НК-клеток при первичных иммунодефицитах (Муругин ВВ и др.2009)

Дегрануляция при стимуляции клетками K562



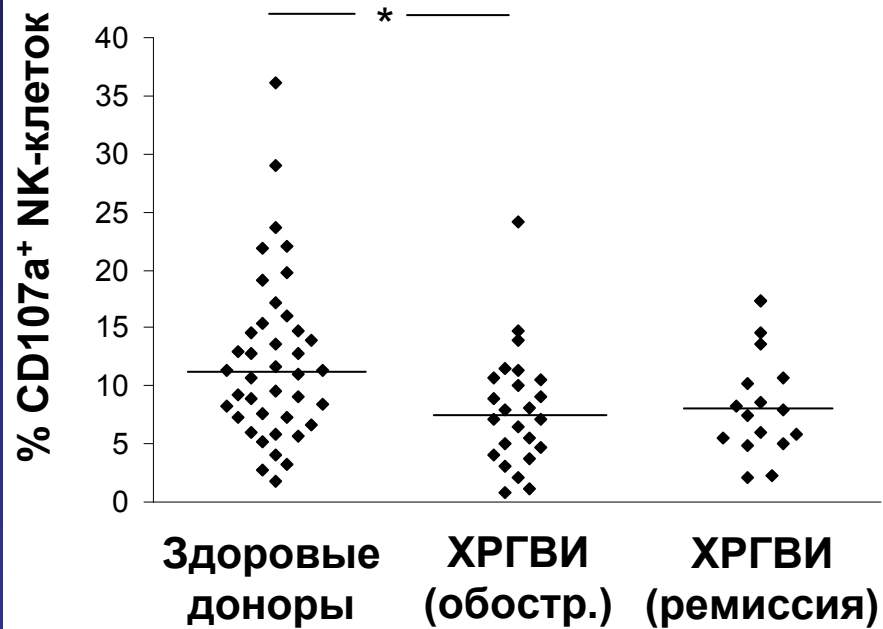
НК-активность



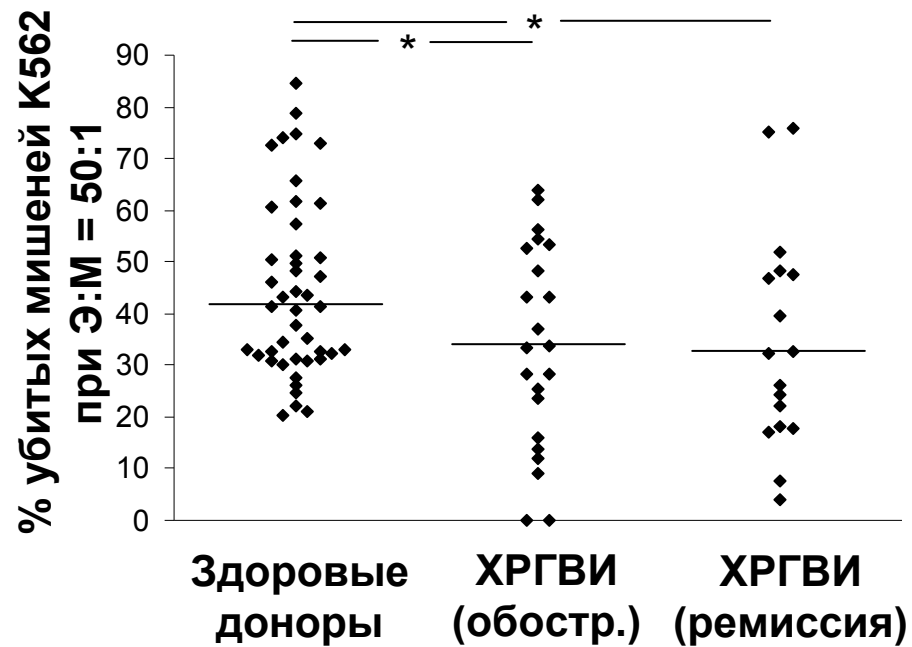
- ◇ Пациенты, получавшие антимикробную или иммуносупрессивную терапию
- ◆ Пациенты, не получавшие терапию на момент исследования

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

Дегрануляция при стимуляции клетками K562



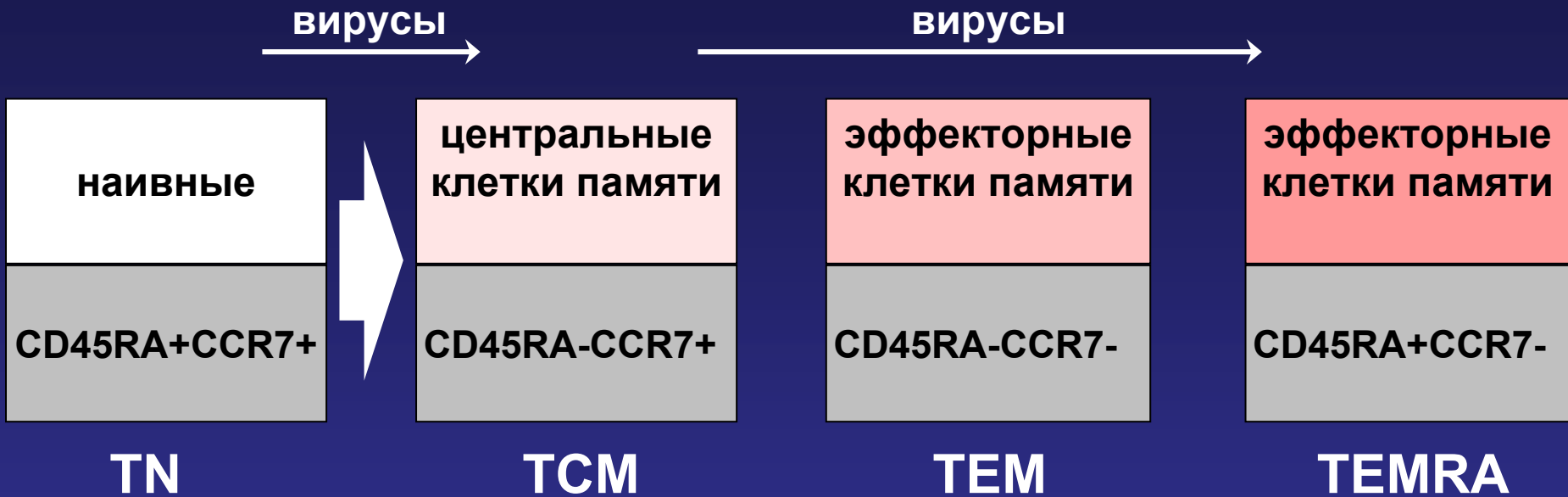
НК-активность



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

(Пащенко 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)