

**АО «Медицинский университет Астана»**

УДК: 614.2:612.017.1:616-092-053.2/8-07-08(574)

МПК: С12N15/00;С07K16/24

**Усенова Оксана Полатовна**

**Оценка эффективности диагностики общей варибельной иммунной недостаточности у пациентов различной возрастной категории**

**6М110100 – «Медицина»**

Диссертация на присуждение академической  
степени магистра

Научный руководитель – д.м.н., профессор АО «МУА» Моренко М.А.

Научный консультант – д.м.н., доцент филиала корпоративного фонда  
«University Medical Center» Республиканский диагностический центр Ковзель  
Е.Ф.

Официальный оппонент – д.м.н., профессор, директор «Республиканского центра санитарной авиации» Отарбаев Н.К.

Астана, 2016

## СОДЕРЖАНИЕ

	НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	4
	ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	5
	ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	7
	СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ.....	9
	ВВЕДЕНИЕ.....	11
1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1	Состояние проблемы первичных иммунодефицитов у пациентов различной возрастной категории.....	15
1.2	Особенности течения первичных иммунодефицитов у пациентов различной возрастной категории.....	16
1.2.1	Клинические варианты течения общей вариабельной иммунной недостаточности.....	18
1.2.2	Характеристика иммунологических показателей при общей вариабельной иммунной недостаточности.....	20
1.3	Генетические дефекты при общей вариабельной иммунной недостаточности.....	22
2	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	24
2.1	Общая характеристика групп пациентов.....	24
2.2	Методы исследования.....	24
2.3	Анамнестические данные.....	26
2.4	Методы клинического исследования.....	27
2.5	Методы иммунологического исследования.....	28
2.5.1	Определение уровней иммуноглобулинов классов А, М, G, Е в сыворотке крови.....	28
2.5.2	Определение содержания клеток периферической крови.....	33
2.5.3	Определение субпопуляций лейкоцитов и экспрессия функциональных молекул.....	34
2.6	Количественное определения молекул ДНК TREC и KREC в сухих пятнах крови.....	38
2.6.1	Выделение ДНК из крови щелочным буфером для анализа TREC и KREC.....	38
2.6.2	Количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в сухих пятнах крови методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.....	39
2.7	Анкетирование.....	39
2.8	Методы статистической обработки.....	40
3	ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫЯВЛЯЕМОСТИ И ОСОБЕННОСТЕЙ ТЕЧЕНИЯ ОБЩЕГО ВАРИАБЕЛЬНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА У ПАЦИЕНТОВ РАЗЛИЧНОЙ ВОЗРАСТНОЙ КАТЕГОРИИ.....	41
3.1	Исследование клинических особенностей течения общей вариа-	42

	большой иммунной недостаточности у пациентов различной возрастной категории с установленным диагнозом.....	
3.2	Исследование пациентов с аутоиммунными заболеваниями для выявления общего переменного иммунодефицита.....	51
3.3	Исследование пациентов с онкогематологическими заболеваниями для выявления общего переменного иммунодефицита.....	55
3.4	Исследование пациентов с туберкулезом для выявления общего переменного иммунодефицита.....	59
3.5	Исследование количественного определения молекул ДНК TREC и KREC у пациентов с общей переменной иммунной недостаточностью.....	63
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	65
	ВЫВОДЫ.....	67
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	68
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	69
	ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	80
	ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	81
	ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	82

## НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

1. Клинический протокол «Первичные иммунодефициты у детей». Утв. МЗ СР РК № 18 от 30.11.15 г.
2. Отарбаев Н.К., Ковзель Е.Ф. Первичные иммунодефициты. Методические рекомендации. – Астана, 2014 г.
3. Международный Фонд первичных иммунодефицитов (Jeffry Modell Fondation).
4. Европейское общество иммунодефицитов (European Society for Immunodeficiencies, ESID).

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяются следующие термины с соответствующими определениями:

**Первичные иммунодефициты (ПИД)** - наследственные или приобретённые во внутриутробном периоде иммунодефицитные состояния. Обычно они проявляются или сразу после рождения, или в течение первых двух лет жизни (врождённые иммунодефициты)

**Полимеразноцепная реакция (ПЦР)** – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты в биологическом материале (пробе).

**Общая переменная иммунная недостаточность (ОВИН)** – первичное иммунодефицитное состояние с преимущественным дефектом гуморального звена иммунитета, проявляющееся, как в детском, так и в зрелом возрасте и имеющее полиморфизм генных нарушений.

**Имуноглобулин А (IgA)** - сывороточный IgA составляет 15-20% всей фракции иммуноглобулинов, содержится в серозно-слизистых секретах, основной функцией IgA является защита слизистых оболочек дыхательных, мочеполовых путей и желудочно-кишечного тракта от инфекций.

**Имуноглобулин Е (IgE)** - в свободном виде в плазме почти отсутствует, способен осуществлять защитную функцию в организме от действия паразитарных инфекций, обуславливает многие аллергические реакции. Механизм действия IgE проявляется через связывание с высоким сродством с поверхностными структурами базофилов и тучных клеток, с последующим присоединением к ним антигена, вызывая дегрануляцию и выброс в кровь высоко активных аминов (гистамина и серотонина — медиаторов воспаления).

**Имуноглобулин G (IgG)** - составляет 70-80 % всей фракции иммуноглобулинов и 10-20 % общего белка сыворотки, это доминирующий иммуноглобулин сыворотки в количественном отношении, наиболее активен во вторичном иммунном ответе и антитоксическом иммунитете. Синтезируются В-лимфоцитами (плазмочитами). Благодаря малым размерам (коэффициент седиментации 7S, молекулярная масса 146 кДа) является единственной фракцией иммуноглобулинов, способной к транспорту через плацентарный барьер, обуславливая тем самым иммунитет плода и новорожденного в течение первых 4-6 месяцев жизни.

**Имуноглобулин М (IgM)** - появляются при первичном иммунном ответе В-лимфоцитами на ранее неизвестный антиген; составляют до 10% фракции иммуноглобулинов. Образование IgM происходит ещё в пре-В-лимфоцитах, в которых первично синтезируются из  $\mu$ -цепи; синтез лёгких цепей в пре-В-клетках обеспечивает их связывание с  $\mu$ -цепями, в результате образуются функционально активные IgM, которые встраиваются в поверхностные структуры плазматической мембраны, выполняя роль антиген-распознающего рецептора; с

этого момента клетки пре-В-лимфоцитов становятся зрелыми и способны участвовать в иммунном ответе.

**TACI** – трансмембранный активатор и партнёр кальциевого модулятора и лиганда циклофилина.

**BAFF-R** - фактор активатора рецепторов В-клеток, член семейства рецепторов TNF, расположен на хромосоме 22q13.

**ICOS** – индуцируемый Т-клеточный костимулятор представляет собой рецептор клеточной поверхности структурно и функционально связанный с CD28.

**DEFI**- французская исследовательская группа по первичным иммунодефицитам.

**LOCID** - позднее начало комбинированного иммунодефицита, подгруппа общей вариабельной иммунной недостаточности с клинически значимой недостаточностью Т-клеток.

**Т-рецепторные эксцизионные кольца (T-cell receptor excision circles - TREC)**- структуры формирующиеся в процессе перестройки генов Т-клеточного рецептора, когда часть генетического материала вырезается, замыкается в кольцо и служит маркером Т-клеток, недавно мигрировавших из тимуса и ещё не вступивших в процесс пролиферации.

**В-клеточные эксцизионные кольца (kappa-deleting recombination excision circles- KREC)** - образуются аналогично образом как и Т-клеточные эксцизионные кольца, содержание KREC в периферической крови является также суррогатным маркером эффективности развития В-клеточного звена иммунной системы в процессе эмбриогенеза.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВОЗ	- Всемирная Организация Здравоохранения
ОРВИ	- острые респираторные вирусные инфекции
ПИД	- первичный иммунодефицит
ТКИН	- тяжелая комбинированная иммунная недостаточность
ОВИН	- общая переменная иммунная недостаточность
ESID	- Европейское Сообщество Иммунодефицитов
IgA	- иммуноглобулины класса А
IgE	- иммуноглобулины класса Е
IgG	- иммуноглобулины класса G
IgM	- иммуноглобулины класса М
IUIS	- Международный Союз Иммунологических Сообществ
JFM	- Фонд Джеффри Моделл
JMCN	- сеть центров Джеффри Моделл
M	- среднее арифметическое значение
M	- стандартная ошибка среднего значения
KREC	- В-клеточные эксцизионные кольца
TREC	- Т-рецепторные эксцизионные кольца
ПЦР	- полимеразноцепная реакция
CD3+	- Т-лимфоциты
CD3+CD4+	- Т-хелперы
CD3+CD8+	- цитотоксические Т-клетки
CD19+	- В-лимфоциты
CD3-CD16+CD56+	- натуральные киллеры
CD19+CD27+IgD-	- IgD-переключенные В-лимфоциты памяти
CD19+CD27+IgD+	- IgD-непереключенные В-лимфоциты памяти или В-лимфоциты маргинальной зоны
CD19+CD27-IgD+	- наивные IgD+ В-лимфоциты
CD19+CD27+IgM-	- IgM-переключенные В-лимфоциты памяти
CD19+CD27+IgM+	- IgM-непереключенные В-лимфоциты памяти или В-лимфоциты маргинальной зоны
CD19+CD27-IgM+	- наивные IgM+ В-лимфоциты
CD19+CD21-, CD19+CD21-CD38-, CD19+CD21-CD38++	- функционально-незрелые В-лимфоциты
CD20+CD5+, CD19+CD24++CD38++, CD19+CD38++IgM++	- регуляторные В-лимфоциты
TAC1	- трансмембранный активатор и партнёр кальциевого модулятора и лиганда циклофилина
BAFF-R	- фактор активатора рецепторов В-клеток, член се-

места рецепторов TNF, расположен на хромосоме 22q13.

ICOS  
DEFI

- индуцируемый Т-клеточный костимулятор  
- французская исследовательская группа по первичным иммунодефицитам

LOCID

- позднее начало комбинированного иммунодефицита



## СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ

Таблица 1 - Методы исследования и объем выполненной работы	25
Таблица 2- Общая характеристика обследованных пациентов, включенных в исследование	42
Таблица 3 - Диспансерная группа пациентов с ОВИН	44
Таблица 4 - Характеристика пациентов с общей вариабельной иммунной недостаточностью, включенных в исследование	45
Таблица 5 - Характеристика контрольной группы, включенной в исследование	45
Таблица 6 - Структура основных нозологий у пациентов с ОВИН	46
Таблица 7 - Структура основных осложнений у пациентов с ОВИН	47
Таблица 8 - Показатели иммуноглобулинов класса G, A, M в крови пациентов с ОВИН и контрольной группы	48
Таблица 9 - Показатели иммунограммы в крови у пациентов с установленным диагнозом ОВИН и у контрольной группы	48
Таблица 10 - Структура возрастного состава и число случаев инфекционного синдрома у пациентов с ОВИН	49
Таблица 11 - Характеристика пациентов с аутоиммунными заболеваниями, включенных в исследование для выявления ОВИН	50
Таблица 12 - Структура возрастного состава пациентов с аутоиммунными заболеваниями	51
Таблица 13 — Показатели иммуноглобулинов класса G крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями	52
Таблица 14 — Показатели иммунограммы у пациентов с аутоиммунными заболеваниями	53
Таблица 15 - Характеристика пациентов с онкогематологическими заболеваниями, включенных в исследование для выявления ОВИН	54
Таблица 16 - Структура возрастного состава пациентов с онкогематологическими заболеваниями	55
Таблица 17 — Показатели иммуноглобулинов класса G крови пациентов с онкогематологическими заболеваниями	56
Таблица 18 — Показатели иммунограммы у пациентов с онкогематологическими пациентами заболеваниями	57
Таблица 19 - Характеристика пациентов с туберкулезом легких, включенных в исследование для выявления ОВИН	58
Таблица 20 - Структура возрастного состава пациентов с туберкулезом легких	59
Таблица 21 — Показатели иммуноглобулинов класса G крови пациентов с туберкулезом легких	60
Таблица 22 — Показатели иммунограммы у пациентов с туберкулезом легких	61
Таблица 23 — Показатели KREC и TREC у пациентов с ОВИН	62

Рисунок 1 - Дизайн исследования	25
Рисунок 2 - Пример выделения ворот для определения субпопуляций В-лимфоцитов	35
Рисунок 3 - Пример определения изотип-переключенные В клетки памяти	36
Рисунок 4 – Пример определения функционально незрелых В лимфоцитов CD19+CD21-	36
Рисунок 5 – Пример определения методом проточной цитометрии наивные Т-хелперы (CD4+CD45RA+), Т-хелперы памяти (CD4+CD45RO+), наивные цитотоксические Т-лимфоциты (CD8+CD45RA+) и цитотоксические Т-клетки памяти (CD8+CD45RO+)	37
Рисунок 6 – Характеристика пациентов с ОВИН	43
Рисунок 7 - Структура распределение зарегистрированных больных с ОВИН, учитывая территориальную принадлежность (2016 год)	44
Рисунок 8 - Структура возрастного состава пациентов с ОВИН	45
Рисунок 9 - Структура возрастного состава контрольной группы	46
Рисунок 10 - Характеристика пациентов с аутоиммунными заболеваниями, включенных в исследование для выявления ОВИН	50
Рисунок 11 - Структура возрастного состава пациентов с аутоиммунными заболеваниями	51
Рисунок 12 - Показатели иммуноглобулинов класса G крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями	52
Рисунок 13 - Характеристика пациентов с онкогематологическими заболеваниями, включенных в исследование для выявления ОВИН	54
Рисунок 14 - Структура возрастного состава пациентов с онкогематологическими заболеваниями	55
Рисунок 15 — Показатели иммуноглобулинов класса G крови пациентов с онкогематологическими заболеваниями	56
Рисунок 16 - Характеристика пациентов с туберкулезом легких, включенных в исследование для выявления ОВИН	58
Рисунок 17 - Структура возрастного состава пациентов с туберкулезом легких	59
Рисунок 18 — Показатели иммуноглобулинов класса G крови пациентов с туберкулезом легких	60
Рисунок 19 – Программа амплификации	63
Рисунок 20 - Показатели KREC у пациентов с ОВИН	64
Рисунок 21 - Показатели TREC у пациентов с ОВИН	64

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

В последние годы стало очевидным, что первичные иммунодефициты (ПИД) — более частые заболевания, чем это предполагалось ранее. Частота встречаемости ПИД в мире составляет в среднем 1:10 000 (суммарно по всем формам) и сравнима с частотой муковисцидоза [1].

Частота врожденных дефектов иммунной системы по данным Европейского Общества по Первичным Иммунодефицитам, составляет 1:25 000 – 1:1 000 000 [2,3]. В настоящее время описывается уже более 200 генетических дефектов детерминирующих тяжелые нарушения функции иммунной системы. Причины генетических дефектов иммунной системы, передающихся по наследству, практически не известны, в качестве мутагенов предполагается действие различных экологических факторов, в том числе и радиоактивное излучение.

При сравнении европейских данных с числом жителей Республики Казахстан, то на настоящий момент в нашей стране должно быть не менее 3000 пациентов с врожденным дефектом иммунной системы, причем эта цифра относится не только к детям, но и к взрослым. В настоящий момент в Республике Казахстан зарегистрировано около 10 пациентов с первичными иммунодефицитами, диагноз которым был установлен в детском возрасте [4]. Большая часть больных данной патологией не диагностируется или диагностируются очень поздно, и они умирают от инфекционных, онкологических, неврологических, аутоиммунных или других заболеваний. Отсутствие четких алгоритмов и использование устаревших технологий значительно затягивают процесс диагностики, что ведет к пролонгированию дорогостоящего неспецифического лечения вместо проведения эффективной иммуотропной терапии. Однако, скорость внедрения новых технологий не позволяет считать безнадежными даже больных с наиболее тяжелыми вариантами ПИД. Диагноз первичный иммунодефицит констатируется только в совокупности клинического, иммунологического и/или генетического методов обследования.

В структуре первичных иммунодефицитов преобладают дефекты гуморального звена иммунитета, среди которых наиболее распространен комплекс заболеваний под названием Общая Варибельная Иммунная Недостаточность (ОВИН). ОВИН – врожденный иммунодефицит манифестирующийся не только в детском, но и взрослом возрасте, в основе данного заболевания лежат множественные генетические дефекты, большинство из которых до сих пор не известны, иммунологически проявляющиеся выраженной гипогаммаглобулиемией. Рациональное применение заместительной терапии позволяет значительно снизить частоту инфекционных осложнений, улучшить качество жизни и тем самым продлить полноценную жизнь на несколько десятилетий. Применение трансплантации гемопоэтической стволовой клетки при тяжелых клеточных дефектах

иммунной системы в детском возрасте позволяет практически полностью избавиться от данного заболевания.

Общий переменный иммунодефицит - это дефект формирования специфического иммунного ответа, который лабораторно проявляется снижением уровней 2-3-х иммуноглобулинов (IgG и/или IgM и/или IgA) и нарушением формирования титра специфических антител при нормальном содержании В-лимфоцитов в периферической крови. Однако углубленные иммунологические исследования последних лет показали, что в большинстве случаев ОВИН - это дефект пост-антигенной дифференцировки В-лимфоцитов и формирования плазмобластов. У большинства пациентов с ранней и поздней манифестацией заболевания в периферической крови наблюдается резкое снижение либо полное отсутствие В-лимфоцитов памяти с различными фенотипами (CD19+CD27+IgD-/CD19+CD27+IgD+, CD19+CD27+IgM-/CD19+CD27+IgM+), что помогает более точно установить диагноз при совокупности всех других клинических и лабораторных признаков. При ранней манифестации ОВИН, в детском возрасте, у пациентов имеется повышенный риск развития аутоиммунной патологии, в таких случаях дети часто находятся под наблюдением врачей-ревматологов и гематологов и остаются не диагностированы по основному заболеванию. В таких случаях наряду с заместительной терапией иммуноглобулином показана специфическая иммуносупрессивная терапия. Генетической основой ОВИН являются мутации в ряде генов (TACI, BAFF-R, ICOS и др.), мутации в описанных генах встречаются в 20% случаев. Учитывая переменность клинических проявлений в различные возрастные периоды и диагностических мероприятий, необходим более дифференцированный подход к диагностике и лечению пациентов. Наличие в основе данного заболевания множественных генетических дефектов, выявление наиболее известных и значимых, в генах TACI, BAFF-R, ICOS, позволит улучшить диагностику данного заболевания [5,6].

Таким образом, необходим анализ заболеваемости общей переменной иммунной недостаточности и разработка алгоритма диагностики и лечения на разных этапах оказания медицинской помощи пациенту в Республике Казахстана.

**Цель исследования:**

Оптимизировать диагностику общей переменной иммунной недостаточности пациентам различных возрастных категорий.

**Объект и предмет исследования:**

Работа основана на анализе результатов обследования 258 пациентов с подозрением на первичный иммунодефицит от 2 до 55 лет, из них 153 пациента с инфекционными заболеваниями, 42 пациента с туберкулезом легких, 22 пациента с аутоиммунными заболеваниями и 41 пациент с онкогематологическими заболеваниями. Обследованные пациенты находились на лечении в Национальном научном центре материнства и детства, ГККП «Противотуберкулезный диспансер», Центр трансплантологии и онкологии.

**Задачи исследования:**

1. Изучить частоту заболеваемости ОВИН по результатам проведенного комплекса диагностических мероприятий в РК.
2. Выявить особенности клинического течения ОВИН у пациентов различных возрастных групп и определить наиболее значимые критерии для эффективной диагностики заболевания.
3. Разработать алгоритм диагностических и лечебных мероприятий у пациентов с ОВИН на разных этапах оказания медицинской помощи.

**Методы исследования**

1. Общеклиническое обследование
2. Иммунологическое исследование.
3. Биохимические исследования.

**Научная новизна результатов исследования:**

1. Впервые проведено расширенное клинико-эпидемиологическое исследование по выявляемости ОВИН в Республике Казахстан.
2. Определен комплекс диагностических, лечебных мероприятий на разных этапах оказания медицинской помощи, который позволит значительно повысить качество жизни пациентов, снизить смертность, инвалидность и экономические затраты на лечение.

**Практическая значимость:**

1. На основании проведенного исследования получены данные, которые свидетельствуют о низкой, несвоевременной диагностике ОВИН, приводящие к развитию тяжелых осложнений, инвалидизации и экономических потерь.
2. Выявлены наиболее значимые клинические синдромы, диагностические маркеры, которые позволят проводить диагностику на ранних этапах заболевания.
3. Разработан алгоритм диагностики ОВИН на разных этапах оказания медицинской помощи.
4. Оптимизация диагностики и лечения пациентов с ОВИН позволит значительно повысить их качество жизни, снизить смертность, инвалидность и экономические затраты на лечение.

**Основные положения, выносимые на защиту**

1. Выявлены наиболее значимые клинические синдромы, диагностические маркеры, которые позволят проводить диагностику на ранних этапах заболевания.
2. Оптимизация диагностики и лечения пациентов с ОВИН позволит значительно повысить их качество жизни, снизить смертность, инвалидность и экономические затраты на лечение.

**Структура и объём работы:**

Диссертационная работа изложена на 82 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы, описывающей материалы и методы исследования, глав, содержащих результаты собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, включающей 139 источников, в том числе на русском языке 8 и 131 иностранных. Текст иллюстрирован 23 таблицами, 21 рисунком.

**Апробация материалов диссертации:**

Основные положения работы изложены:

- на заседании кафедры детских болезней №1, АО «Медицинский университет Астана»;
- на заседании Научного семинара по терапевтическим и смежным специальностям АО «Медицинский университет Астана»;
- на 58 – ой научно – практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием, 14 – 15 апреля 2016 года, г. Астана.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ РАЗЛИЧНОЙ ВОЗРАСТНОЙ КАТЕГОРИИ

Согласно определению, первичные иммунодефициты являются генетически детерминированными заболеваниями, основополагающими которых являются молекулярные либо органические дефекты, сопровождающиеся нарушениями иммунных реакций, при этом наблюдается клиника инфекционных и аутоиммунных заболеваний, а также повышенный риск развития злокачественных новообразований. Данное определение сформулировано Международным союзом иммунологических обществ (International Union of Immunological Societies (IUIS)) в 2011 году [7, 81].

Истоки изучения данной группы заболеваний берут начало с середины прошлого века, с описания случая 8-ми летнего мальчика с агаммаглобулинемией в журнале «Педиатрия» американским педиатром О. Брутоном (Иллинойс, США, 1952 г.). [2, 3, 4, 5]. В последние годы группа заболеваний, как первичные иммунодефициты активно исследуют ученые и врачи иммунологи [3, 6].

Первичные иммунодефициты более частые заболевания, чем это предполагалось ранее. Распространенность первичных иммунодефицитов в мире по данным статистических данных в среднем 1:10 000 [7, 8, 9, 10]. Известно, что частота встречаемости ПИД в Европе много больше, чем количество зарегистрированных случаев в Казахстане, что является следствием отсутствия регистрации больных. Большая часть пациентов с данной патологией не диагностируется или диагностируются очень поздно, и они умирают от инфекционных, онкологических, неврологических, аутоиммунных и других нозологий [11, 12]. Отсутствие четких алгоритмов и использование устаревших технологий значительно затягивают процесс диагностики, что ведет к затягиванию дорогостоящего не специфического лечения вместо проведения эффективной иммунотропной терапии. В связи с активным развитием технологий, не оставляет без присмотра пациентов с тяжелыми клиническими вариантами ПИД. Важно отметить, что диагноз первичный иммунодефицит констатируется только в совокупности клинического, иммунологического и генетического методов обследования [13, 14, 15].

Первые эпизоды первичных иммунодефицитов (ПИД) проявляются в раннем детстве, но также ПИД могут встречаться и среди взрослого населения, первые эпизоды заболевания наблюдаются в 20-30 летнем возрасте [16, 17, 18].

Современные исследования показывают, что первичные иммунодефициты более распространенная группа нозологий, чем предполагалось ранее [20], был сделан вывод, что 1-2% населения во всем мире могут быть с ПИД [21]. За последнее десятилетие, в связи с улучшениями в области молекулярной и генетической диагностики, привело к более глубокому исследованию иммунной системы, а также своевременному началу лечения, следовательно улучшение качества жизни людей, живущих с ПИД [22, 23].

## 1.2 ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ОБЩЕЙ ВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ РАЗЛИЧНОЙ ВОЗРАСТНОЙ КАТЕГОРИИ

ОВИН – врожденный иммунодефицит, манифестирующийся не только в детском, но и взрослом возрасте, в основе данного заболевания лежат множественные генетические дефекты, большинство из которых до сих пор не известны, иммунологически проявляющиеся выраженной гипогаммаглобулиемией [24].

Проведенные исследования показывают, что распространенность ОВИН составляет примерно 1:25 000 в общей популяции [24, 25, 26]. Существуют этнические различия в частоте распространенности в некоторых группах населения, особенно низкий уровень, наблюдается в Северо-Восточной Азии [27, 28]. Симптоматика ОВИН проявляется у пациентов в зрелом возрасте [29], однако, тщательно собранный анамнез, может выявить симптомы у пациентов, начиная с раннего детства, что характеризуется рецидивирующими тяжелыми инфекциями, аутоиммунными, аллергическими и злокачественными заболеваниями.

В последние два десятилетия, было несколько попыток разгадать генетические дефекты ОВИН. Проведенные исследования геномов у членов семей пациентов с ОВИН показали, что дефекты генов обычно обнаруживали не более чем у одного члена семьи, около 10% родственников первой степени выявлялась гипогаммаглобулинемия, либо селективный дефицит IgA [30, 31].

У большинства пациентов не была выявлена генетическая основа ОВИН. При этом, предполагалось, что при ОВИН имеются полигенные расстройства [32]. В исследованиях Grimbacher В. и соавт. были выявлены единичные пациенты с одиночными дефектами генов, а также продемонстрировано, что мутации ICOS, CD19, CD20, CD21 и CD81 приводят к тяжелому клеточному или гуморальному дефекту [33, 34, 35, 36]. Идентификация дефекта одного из вышперечисленных генов позволяет распознавать пациентов с ОВИН [33].

Мутации и полиморфизм в других генах, таких как TAC1, рецептора-BAFF и MSH5, являются менее диагностически значимыми при постановке диагноза ОВИН. Мутации этих генов были идентифицированы у здоровых людей [22, 23, 24]. Существует теория о том, что у «здоровых» людей могут обнаруживаться эти гены, однако, первые клинические признаки ОВИН начнут проявляться в старческом возрасте (плечо генов) [13].

При ОВИН наблюдается заметное снижение уровня сывороточных IgG (обычно <3 г/л) и IgA (<0,05 г/л), со снижением в сыворотке IgM, примерно в половине всех выявленных клинических случаев. [13, 25, 26, 27, 28, 29].

Индукцируемый Т-клеточный костимулятор (ICOS) представляет собой рецептор клеточной поверхности структурно и функционально связанный с CD28 [30]. Функционально ICOS важен для производства IL-10, цитокина причастного к образованию В-клеток памяти и плазматических клеток. Grimbacher и соавт. описали гомозиготную делецию гена ICOS, который наследуется как ауто-сомно-рецессивный признак у пациентов с ОВИН [31].



Четыре поверхностных белка (CD19, CD21, CD81, CD225 и) образуют комплекс на поверхности зрелых В-клеток, который уменьшает порог активации антигенов [32]. Из них CD19 формируется первым на В-клетках и остается на его поверхности на протяжении дифференцировки вплоть до созревания в плазматические клетки. В 2006 году V.Zelm и соавт. сообщили о четырех больных из двух неродственных семей, которые имели гипогаммаглобулинемию и мутацию гена CD19 [33].

Установлено, что CD20, один из клеточных антигенов дифференцировки В-клеток [34], и экспрессируется на пре-В и зрелых В-клетках, но теряется при дифференцировке в плазматические клетки. В 2010 году, Kuijpers и соавт. сообщили о клиническом случае пациента, с дефицитом CD20 вследствие гомозиготной мутации, клиническая симптоматика данного пациента соответствовала ОВИН, а именно, стойкая гипогаммаглобулинемия, рецидивирующая бронхопневмония, снижение В-клеток памяти, и заметно сниженная способность реагировать на пневмококковые полисахариды [35].

Фактор активатора рецепторов В-клеток (BAFF-R), член семейства рецепторов TNF, расположен на хромосоме 22q13 [36, 37]. BAFF, также называемый BLyS, является лигандом BAFF-R, исследования показали важность взаимодействия BAFF/BAFF-R в выживании В-клеток. У пациентов с дефицитом по BAFF или BAFF-R наблюдается блокирование развития В-клеток [38, 38, 40, 41, 42, 43]. Первоначальные попытки идентифицировать потенциальные мутации в BAFF-R при ОВИН привели к выводу, что в сыворотке снижается число В-клеток. Немецкие исследователи Warnatz и соавт. описали клинический случай пациента с проявлениями частых пневмококковых инфекций, у которого была выявлена гомозиготная делеция гена BAFF-R и низкое содержание сывороточных иммуноглобулинов IgG и IgM при нормальном содержании IgA [48]. Был сделан вывод, что делеция гена BAFF-R вызывает характерный иммунологический фенотип, который приводит в иммунодефицитному состоянию.

## 1.2.1 КЛИНИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ТЕЧЕНИЯ ОБЩЕЙ ВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Более 90% пациентов с ОВИН страдают от повышенной заболеваемости бактериальными инфекциями, поражающие слизистые оболочки верхних и нижних дыхательных путей и, в меньшей степени, желудочно-кишечного тракта. По данным исследовательской группы больницы Маунт Синай в Нью-Йорке по ОВИН и французской исследовательской группы DEFI было показано, примерно две трети из 252 пациентов страдали синуситом или бронхитом и у 50% пациентов имелось по крайней мере одна пневмония во время их жизни. Примерно у одной трети пациентов развились бронхоэктазы в результате хронических рецидивирующих инфекций. Часто обнаруживаемыми патогенами были пневмококк, гемофильная инфекция, золотистый стафилококк и *Moraxella catharralis*. Периодическая и хроническая диарея наблюдалась приблизительно у 40% пациентов и примерно у половины из них возбудителями являлись *Giardia* лямблий, сальмонеллы и *Campylobacter jejuni*. Острый и хронический гастриты, вызванные *Helicobacter Pylori* часто диагностировались у пациентов с ОВИН [49]. У 10% пациентов с ОВИН наблюдался поясывающий герпес Зостер. Редкое, но типичное осложнение гипогаммаглобулинемии, наблюдаемое у пациентов - это олигоартрит, вызванный возбудителем *Mycoplasma*.

Примерно у 10 - 20% пациентов с ОВИН развилась гранулематозная интерстициальная болезнь легких. Микробное тестирование этих пациентов часто не выявляло специфических патогенов [50]. Пациенты с гранулематозной интерстициальной болезнью легких имели значительно худший прогноз, чем другие пациенты ОВИН [51, 52]. Это заболевание дифференцируется с саркоидозом.

Также, наиболее часто у пациентов с ОВИН наблюдались хронические воспалительные заболевания кишечника. При гистологическом исследовании выявлялась атрофия ворсинок, которая больше напоминала аутоиммунную энтеропатию. Поражение толстого кишечника при ОВИН напоминало болезнь Крона и неспецифический язвенный колит, которые были подтверждены гистологически [53, 54]. Узловая гиперплазия лимфоидной ткани, которая обнаруживалась, как в двенадцатиперстной кишке, так и в подвздошной кишке протекала бессимптомно или проявлялась у пациентов с нарушением характера стула [55].

Заболевания печени и изменение тестов функции печени встречаются у 10% пациентов с ОВИН [56, 57]. Наиболее распространенным заболеванием печени у пациентов с ОВИН, была узловая регенеративная гиперплазия ткани печени или серонегативные, гранулематозные гепатиты. Аутоиммунный гепатит не являлся типичным у этих больных. Наличие поражения печени предвещало плохой прогноз дальнейшего течения ОВИН.

Аутоиммунные заболевания наблюдаются приблизительно у 30% пациентов с ОВИН [56, 63,64]. Особенно часто выявлялась аутоиммунная тромбоцитопения (10 до 12%) и аутоиммунная гемолитическая анемия (от 5 до 7%), показывающая значительную корреляцию со спленомегалией [57,65]. Цитопения

может проявляться до, одновременно или после постановки диагноза иммунодефицита. Иммунологически, аутоиммунные цитопении были связаны с низким числом В-клеток памяти, низким числом регуляторных Т-клеток, повышением CD21low В-клеток и узловыми Т-клеточными инфильтратами костного мозга [58].

Доброкачественная лимфопролиферация наблюдалась у 40 - 50% пациентов с ОВИН, часто проявляющаяся, как спленомегалией (от 10 до 20%), так и локальной или распространенной лимфаденопатией [59, 60, 61]. Гистологически выявлялась фолликулярная гиперплазия и гранулематозное воспаление. В сочетании с лимфопролиферацией, пациенты с ОВИН имели повышенный риск развития лимфомы [62, 63]. Большинство выявленных лимфом были В-клеточные неходжкинского типа [64]. Рак желудка - наиболее частое злокачественное заболевание при ОВИН [65, 66, 67, 68, 69]. Также отмечено, что пациенты с ОВИН имели повышенную радиочувствительность, что, как известно, является фактором риска онкологических заболеваний [70, 71].

По данным многих исследований, у пациентов с ОВИН, основными клиническими проявлениями являются повторяющиеся инфекции дыхательной системы, такие как бронхит, синусит, пневмония, однако, и аутоиммунные заболевания и заболевания желудочно-кишечного тракта могут быть также первоначальными клиническими проявлениями ОВИН [72, 73, 74]. В нескольких исследованиях показана частота желудочно-кишечных заболеваний у пациентов с ОВИН, которая варьирует в пределах от 20%-60% [75]. Учитывая, что желудочно-кишечный тракт с большой площадью поверхности содержит иммуноглобулин-продуцирующие клетки в организме и IgA является основным иммуноглобулином, продуцируемым в кишечнике. Желудочно-кишечные заболевания, наблюдаемые у пациентов с ОВИН, включают хроническую диарею, воспаление тонкой или толстой кишки, болезнь Крона или неспецифический язвенный колит, целиакию и аденокарциному желудка.

Таким образом, общая переменная иммунная недостаточность проявляется в любом возрасте, повторяющимися инфекциями дыхательной системы, аутоиммунными и желудочно-кишечными заболеваниями.

## 1.2.2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ОБЩЕЙ ВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Иммунная система больных ОВИН была изучена многими исследованиями, описывались как фенотипические, так и функциональные нарушения в адаптивных механизмах иммунного ответа. Тем не менее, множество этих дефектов, их неравномерное распределение в разных когортах ОВИН и отсутствие реального комплексного и комбинированного анализа, до сих пор не позволили сделать определенный вывод о конкретных нарушениях всех иммунопатогенетических путей, ведущих к ОВИН.

Основываясь на наиболее распространенных дефектах, обнаруженных в Т-клетках и В-клетках адаптивной иммунной системы, были сделаны определенные заключения.

### Нарушения Т-клеток

В течение многих лет аномалии количества и функции клеток CD4 + и CD8 + Т- или были известны или описаны в различных подгруппах пациентов с ОВИН. В значительной части пациенты ОВИН имеют снижение общего лимфоцитов CD4 Т-клеток + и наивных CD4 + CD45RA + [40,44,45]. Отмечалась зависимость в уменьшении CD25 + FoxP3 + -CD4 + Т-клеток и повышении CD21low В-клеток [76] в подгруппе пациентов, у которых ОВИН протекала клинически с повышенной заболеваемостью аутоиммунной патологией, развитием гранулем и спленомегалией [77, 78].

Giovanetti A. и его коллеги [79], обнаружили в клинически значимых подгруппах пациентов с ОВИН, снижение наивных CD4 + Т-клеток. У этих пациентов выявлено значительное снижение наивных CD4 + Т-клеток и признаки массивной активации Т-клеток ассоциированные со спленомегалией и более тяжелым течением заболевания [80].

Французская исследовательская группа DEFI выделила подгруппу ОВИН с клинически значимой недостаточностью Т-клеток и ввела термин «поздним началом комбинированного иммунодефицита» (LOCID) для этих пациентов [81, 82]. Критериями включения были CD4 + Т-клетки ниже 200 мкл с клиническими доказательствами наличия оппортунистических инфекций. LOCID пациенты часто имели близкородственные браки, страдали чаще от саркоидоза, гранулематозной болезни легких, жалобами со стороны желудочно-кишечного тракта, спленомегалией и лимфомой. Таким образом, LOCID пациенты были более тяжелыми и требовали более интенсивной терапии [83].

### Нарушения В-клеток

Общее количество периферических В-клеток у пациентов с ОВИН снижено на 40 - 50% [84, 85]. У некоторых пациентов наблюдалось повышение количества В-клеток, часто связанное с поликлональной лимфоидной инфильтрацией и аутоиммунными заболеваниями [86]. Только у около 10% больных с ОВИН В-клетки резко снижаются или полностью отсутствуют [87]. Прогрессирование заболевания у пациентов с резким снижением В-лимфоцитов, как правило, более быстрое и тяжелое [15, 37, 88, 89].

На клеточном уровне, гипогаммаглобулинемия и дефект специфического ответа антител связано с нарушением терминальной дифференцировки В-клеток в В-клетки памяти и плазматических клеток. Истощение плазматических клеток в лимфоидных органах (лимфатической ткани кишечника, лимфатических узлов, костного мозга) была продемонстрирована в нескольких исследованиях [90, 91, 92]. Кроме того, В-клетки памяти переключенного класса уменьшались у 80 - 90% пациентов с ОВИН [93, 94, 95]. По Фрайбургской классификации различают три группы пациентов с ОВИН на основании процента переключенных В-клеток памяти и повышения активированных, так называемых CD21low В-клеток. В «Парижской» классификация выделяют три подгруппы ОВИН [91], на основании снижения общих В-клеток по отношению к переключенным В-клеткам памяти. Классификация пациентов с ОВИН на основе фенотипа В-клеток является полезной, для выявления клинических подтипов, адаптируя схемы лечения, вакцинации и оценку рисков определенных осложнений [54, 55, 56, 57, 98].

В 2008 году Европейским многоцентровым исследованием, была предложена классификация еврокласса, сочетающая обе системы классификации [96, 97, 98]. Пациенты, у которых более чем 1% циркулирующих В-клеток (В +, > 90% всех пациентов), отличались от тех, у кого менее чем 1% (В-, <10% от всех больных). В + группа дополнительно разбита на подгруппы пациентов с нормальным или сниженным процентным переключенных В-клеток памяти (SMB + > 2% от общего объема В-клеток; smB-, <2% от общего объема В-клеток). Дополнительные подгруппы были созданы в зависимости от повышения CD21low В-клеток или В-клеток переходных. Исследование Euroclass подтвердило клиническую ассоциацию между снижением В-клеток памяти и повышением переключенных клеток CD21low В с клиническими проявлениями в виде спленомегалии и гранулематозной болезнью и также впервые показали повышение переходных В-клеток у пациентов с лимфаденопатией [99, 100].

### 1.3 ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕФЕКТЫ ПРИ ОБЩЕЙ ВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

В последние два десятилетия, было несколько попыток разгадать генетические дефекты ОВИН. Проведенные исследования геномов у членов семей пациентов с ОВИН показали, что дефекты генов обычно обнаруживали не более чем у одного члена семьи, около 10% родственников первой степени родства выявлялась гипогаммаглобулинемия, либо селективный дефицит IgA [101, 102].

У большинства пациентов не была выявлена генетическая основа ОВИН. При этом, предполагалось, что при ОВИН имеются полигенные расстройства [103]. В исследованиях Grimbacher В. и соавт. были выявлены единичные пациенты с одиночными дефектами генов, а также продемонстрировано, что мутации ICOS, CD19, CD20, CD21 и CD81 приводят к тяжелому клеточному или гуморальному дефекту [104, 105, 106, 107]. Идентификация дефекта одного из вышеперечисленных генов позволяет распознавать пациентов с ОВИН [101].

Мутации и полиморфизм в других генах, таких как TAC1, рецептора-BAFF и MSH5, являются менее диагностически значимыми при постановке диагноза ОВИН. Мутации этих генов были идентифицированы и у здоровых людей [108, 109, 110]. Существует теория о том, что у «здоровых» людей могут обнаруживаться эти гены, однако, первые клинические признаки ОВИН начнут проявляться в старческом возрасте («плечо генов») [111].

При ОВИН наблюдается заметное снижение уровня сывороточных IgG (обычно <3 г/л) и IgA (<0,05 г/л), со снижением в сыворотке IgM, примерно в половине всех выявленных клинических случаев. [75, 85, 108, 109, 110].

Индукцируемый Т-клеточный костимулятор (ICOS) представляет собой рецептор клеточной поверхности структурно и функционально связанный с CD28 [111]. Функционально ICOS важен для производства IL-10, цитокина причастного к образованию В-клеток памяти и плазматических клеток. Grimbacher В. и соавт. описали гомозиготную делецию гена ICOS, которая наследуется как аутосомно-рецессивный признак у пациентов с ОВИН [112, 113].

Четыре поверхностных белка (CD19, CD21, CD81, CD225 и) образуют комплекс на поверхности зрелых В-клеток, который уменьшает порог активации антигенов [114, 115]. Из них CD19 формируется первым на В-клетках и остается на его поверхности на протяжении дифференцировки вплоть до созревания в плазматические клетки. В 2006 году V.Zelm и соавт. сообщили о четырех больных из двух неродственных семей, которые имели гипогаммаглобулинемию и мутацию гена CD19 [116].

Установлено, что CD20, один из клеточных антигенов дифференцировки В-клеток [117], и экспрессируется на пре-В и зрелых В-клетках, но теряется при дифференцировке в плазматические клетки. В 2010 году, Kuijpers T.W. и соавт. сообщили о клиническом случае пациента, с дефицитом CD20 вследствие гомозиготной мутации, клиническая симптоматика данного пациента соответствовала ОВИН, а именно, стойкая гипогаммаглобулинемия, рецидивирующая бронхопневмония, снижение В-клеток памяти, и заметно сниженная способность реагировать на пневмококковые полисахариды [118].

Фактор активатора рецепторов В-клеток (BAFF-R), член семейства рецепторов TNF, расположен на хромосоме 22q13 [119]. BAFF, также называемый BLyS, является лигандом BAFF-R. Исследования показали важность взаимодействия BAFF/BAFF-R в выживании В-клеток. У пациентов с дефицитом по BAFF или BAFF-R наблюдается блокирование развития В-клеток [115, 116, 117, 118, 119]. Первоначальные попытки идентифицировать потенциальные мутации в BAFF-R при ОВИН привели к выводу, что в сыворотке снижается число В-клеток. Немецкие исследователи Warnatz К. и соавт. описали клинический случай пациента с проявлениями частых пневмококковых инфекций, у которого была выявлена гомозиготная делеция гена BAFF-R и низкое содержание сывороточных иммуноглобулинов IgG и IgM при нормальном содержании IgA [120, 121, 122]. Был сделан вывод, что делеция гена BAFF-R вызывает характерный иммунологический фенотип, который приводит в иммунодефицитному состоянию.

В основе ее патогенеза лежат наиболее известные и значимые генетические дефекты, в генах TACI, BAFF-R, ICOS, выявление которых в точечных мутациях позволит значительно повысить уровень диагностики этого заболевания [123, 124].

## **2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Общая характеристика групп пациентов**

Научно-исследовательская работа проводилась в рамках гранта «Разработка и внедрение комплекса высокотехнологической медицинской помощи пациентам с общей вариабельной иммунной недостаточностью в Республике Казахстан» АО «Республиканский диагностический центр».

В исследование были включены 30 пациентов с установленным диагнозом ОВИН. Отбор пациентов, с подозрением на ОВИН, осуществлялся на базе АО «Республиканский диагностический центр», Национального научного центра материнства и детства (отделение ревматологии), ГККП «Противотуберкулезный диспансер», Центр трансплантологии и онкологии г. Астаны (отделение онкогематологии), областных больниц, поликлиник Алматинской, Карагандинской, Западно-Казахстанской, Мангыстауской и Атырауской областей с 2014 по 2016 гг. Окончательная верификация диагноза была проведена на базе АО «Республиканский диагностический центр».

Исследование выполнено в дизайне пилотного, аналитического, эпидемиологического, проспективного.

Обследованию подлежали пациенты от 2 до 55 лет с подозрением на ОВИН, с целью определения общеклинических, функциональных, иммунологических нарушений, и проведена оценка выявляемости пациентов с ОВИН, согласно клиническому протоколу «Первичные иммунодефициты у детей». Утв. МЗ СР РК № 18 от 30.11.15 г. Исследование проводилось на основе анализа результатов клинического наблюдения, обследования 258 пациентов, пациентов с инфекционными заболеваниями, с туберкулезом легких, аутоиммунными, онкогематологическими заболеваниями.

В контрольную группу были включены 20 условно здоровых пациентов в возрасте от 2 лет до 18 лет – 5 пациентов, от 18 лет до 30 лет – 15 пациентов, от 30 лет до 50 лет – 5 пациентов (10 мужского пола, 10 женского пола). Периферическая кровь доноров забиралась в пробирки с ЭДТА на базе АО «РДЦ» у студентов, магистрантов, сотрудников АО «МУА» и профилактического обследования детей.

### **2.2 Методы исследования**

В ходе работы были проведены общепринятые методы исследования: анамнестические данные, антропометрические показатели, общеклинические, функциональные, иммунологические методы исследований, а также анкетирование.

Комплекс лабораторных и инструментальных исследований проводился на следующих лабораторий: клиничко-диагностической лаборатории «Олимп» и на базе клиничко-диагностической лаборатории АО «Республиканский диагностический центр».



Пациентам было проведено комплексное обследование на момент обращения.



Рисунок 1 - Дизайн исследования

Диагноз общий переменный иммунодефицит (ОВИИ) устанавливали на основе объективных данных, клинической симптоматики, анализа наследственности, результатов клинко-лабораторных, инструментальных, функциональных и иммунологических методов обследования. Методы исследования и объем выполненной работы представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Методы исследования и объем выполненной работы

№	Методы исследования	I	II	Кол-во обследованных детей
1	2	3	4	5
1	Анамнестические данные	258	20	278
2	Клиническое обследование	258	20	278

3	Определение иммуноглобулинов класса А, М, G	258	20	278
4	Определение CD3+ %, CD3+ DR+ %, DR от CD3, CD4+ %, CD8+ %, CD3-CD8+ %, CD4/ CD8, CD4+ CD25+ %, CD19+ %, NK+ % CD3+ NK+ %, CD45+ %	30	20	50
5	Определения молекул ДНК TREC и KREC в сухих пятнах крови	20	-	20
6	Анкетирование	258	20	278
	<b>ИТОГО</b>	1082	100	1182
<b>Примечание</b> – обозначение I группа, n-258, экспериментальная, пациенты от 2 до 55 лет с подозрением на ОВИН, II– группа детей, n-20, контрольная, 20 условно здоровых пациентов в возрасте от 2 лет до 18 лет – 5 пациентов, от 18 лет до 30 лет – 15 пациентов, от 30 лет до 50 лет – 5 пациентов; За весь период исследования было осмотрено 278 пациентов.				

### 2.3. Анамнестические данные

В ходе исследования также проводился сбор анамнеза и обследование пациентов, с подозрением на общий переменный иммунодефицит. В данную группу вошли, пациенты с респираторными заболеваниями n=153, пациенты с туберкулезом легких n=42, пациенты с аутоиммунными заболеваниями n=22, пациенты с онкогематологическими заболеваниями n=41.

Для проведения научных и клинических исследований от родителей пациентов, пациентов и здоровых доноров было получено информированное согласие. Исследование было одобрено этической комиссией АО «РДЦ» (Приложение 1).

Обследование пациентов проводилось согласно разработанному алгоритму клинико-иммунологической диагностики пациентов с ОВИН (Приложение 2).

Проводилось анкетирование пациентов специально разработанной анкетой, состоящей из 10 вопросов, на основании 10 признаков первичных иммунодефицитов, разработанных Curing P. I. Worldwide, Jeffrey Modell Foundation, с изменениями, адаптированными для ОВИН, с целью первичного отбора пациентов с туберкулезом легких, аутоиммунными заболеваниями, лимфомами и острыми лейкозами (Приложение 3).

## 2.4 Методы клинического исследования

### Антропометрия

Для расчета массы тела в работе использовалась формула Кьютла, или Индекс массы тела (ИМТ, в английском варианте — BODY MASS INDEX (BMI))

Этот способ расчета веса на сегодняшний день считается лучшим, его признали во всем мире.

**ВМІ** рассчитывается по формуле:

$$\text{ВМІ} = \frac{m}{h^2}$$

где *m* - масса тела человека (в килограммах), а *h* - рост человека (в метрах).

### Методика проведения пульсоксиметрии

Для исследования насыщения гемоглобина артериальной капиллярной крови кислородом (сатурации) использовался портативный пульсоксиметр CMS50DL (CONTEC, Германия).

**Пульсоксиметр** – это современный контрольно-диагностический медицинский аппарат, рассчитанный для измерения насыщения гемоглобина артериальной капиллярной крови кислородом (сатурации).

**Пульсоксиметрия** – неинвазивный метод измерения процентного содержания оксигемоглобина в артериальной крови (сатурации). Принцип работы пульсоксиметра базируется на анализе поглощения красного и инфракрасного излучения гемоглобином крови. У связанного и несвязанного с кислородом гемоглобина спектры поглощения света разные. Пульсоксиметр «просвечивает» мягкие ткани пальца и улавливает разницу в поглощении света. Источниками излучения в пульсоксиметрическом датчике являются два встроенных светоизлучающих диода. Излучаемый ими свет проникает сквозь мягкие ткани и принимается фотоприемником, от которого результат замера передается вычислительному блоку (микропроцессору). Пульсоксиметр, как правило, включает в себя вычислительный (компьютерный) блок и специализированный датчик, фиксирующий на пальце пациента.

#### **Техника выполнения:**

1. Перед применением прибора, нужно проверить уровень заряда батареи.
2. После включения подождать несколько секунд, пока прибор закончит самотестирование;
3. Датчик должен закрепляться на пальце так, чтобы фиксация была надежной, а излишнее давление отсутствовало;
4. Ноготь пальца, избранного для исследования, должен быть чистым.
5. Подождать от 5 до 20 секунд, и прибор выведет на дисплей данные по насыщению крови кислородом (сатурации) и пульсу.

## 2.5 Методы иммунологического исследования

### 2.5.1 Определение уровней иммуноглобулинов классов А, М, G, Е в сыворотке крови

#### Определение иммуноглобулина М

**Назначение.** Набор для *in vitro* диагностики. Предназначен для количественного определения иммуноглобулина М (IgM) в сыворотке и плазме крови человека на анализаторах Roche/Hitachi Cobas с.

**Теоретическое обоснование.** В обычном состоянии IgM состоит из 10 тяжелых  $\mu$ -цепей и 10 легких цепей каппа или лямбда типа, которые всегда идентичны в молекуле. Также существует J-цепь, соединяющая  $\mu$ -цепи вместе, проще говоря, по сравнению с IgG IgM обладает пятимерной структурой. IgM представляет собой самую большую молекулу иммуноглобулина (молекулярная масса = 970000), но занимает только 6% иммуноглобулинов в плазме. IgM – то первое специфичное антитело, которое появляется в сыворотке крови человека после возникновения инфекции. Оно способно активировать комплемент, помогая таким образом убивать бактерии. По мере того, как инфекция уменьшается, по сравнению с IgG уровни IgM снижаются с относительно высокой скоростью. Этот факт играет вспомогательную роль в дифференциальной диагностике острых и хронических инфекций с помощью сопоставления специфичных титров IgM и IgG. Если преобладает IgM – инфекция острая, если же преобладает IgG – инфекция хроническая (например, краснуха или вирусный гепатит). Повышенная концентрация поликлонального IgM может иметь место при наличии вирусных, бактериальных и паразитических инфекций, заболеваний печени, ревматоидном артрите, склеродерме, муковисцидозе и пристрастия к героину. Концентрация моноклонального IgM повышена при наличии болезни Вальденстрёма – макроглобулинемии. Повышенная потеря IgM имеет место в процессе энтеропатий с потерей протеина и в результате ожогов. Снижение синтеза IgM имеет место при наличии синдромов приобретенного и врожденного иммунодефицита. В результате медленного начала синтеза IgM концентрация IgM в сыворотке младенцев ниже, чем у взрослых. Использование специфичных антител для количественного определения сывороточных белков является ценным диагностическим инструментом. Светорассеивающие свойства скоплений антиген/антитело впервые наблюдались Pore и Healey в 1938 г. и были позже подтверждены Gitlin и Edelhoeh. Ritchie использовал турбидиметрические измерения для количественного анализа специфичных белков. Количественное определение иммуноглобулинов также может проводиться при помощи нефелометрических методов. Активация полимеров при помощи полиэтиленгликоля (ПЭГ) для улучшения чувствительности и увеличения скорости образования комплекса антиген/антитело описана в работах Lizana и Hellsing. Тест Roche IgM основан на принципе иммунологической агглютинации. В дополнение к стандартной аппликации (набор IGM-2) для количественного определения низкой концентрации IgM в образцах, полученных у детей, была разработана чувствительная аппликация (набор IGMP2) [125, 126].

Известно, что так называемые парапротеины, выделяемые при моноклональных гаммапатиях (моноклональная иммуноглобулинемия), могут отличаться от соответствующих иммуноглобулинов поликлонального происхождения по аминокислотному составу и размеру. Это может нарушать связывание с антителом и, следовательно, точность количественного анализа.

**Принцип метода:** Иммунотурбидиметрический анализ.

Антитела к IgM реагируют с антигеном в образце с формированием комплекса антиген/антитело. После агглютинации результат измеряется турбидиметрически. Добавление полиэтиленгликоля позволяет реакции быстро достичь конечной точки, повышает чувствительность и снижает риск получения ложноотрицательных результатов в образцах, содержащих избыток антигена.

**Реагенты - рабочие растворы:**

**R1** ТРИС-буфер: 20 ммоль/л, pH 8.0; NaCl: 200 ммоль/л; полиэтиленгликоль: 3.6 %; консервант; стабилизаторы.

**R2** Античеловеческие IgM антитела (козы): разного титра; ТРИС-буфер: 20 ммоль/л, pH 8.0; NaCl: 150 ммоль/л; консервант R1 находится в позиции B, R2 — в позиции C.

**Расчет:** Анализаторы Roche/Hitachi Cobas с автоматически рассчитывают концентрацию аналита в каждом образце.

Коэффициенты мг/дл  $\times 0.01 =$  г/л  $\times 1.03 =$  мкмоль/л

пересчета: г/л  $\times 100 =$  мг/дл  $\times 0.971 =$  г/л

### Определение иммуноглобулина А

**Общая информация:** Иммуноглобулин А (IgA) составляет 13 % всех иммуноглобулинов плазмы крови; он выполняет функцию защиты кожи и слизистой оболочки от микроорганизмов. Он способен связывать токсины и в комбинации с лизоцимом проявляет антибактериальную и противовирусную активность. IgA является доминирующим иммуноглобулином в секретах организма, таких как молоко, слюна и пот. Секреторный иммуноглобулин А обеспечивает защиту от местных инфекций, а также играет важную роль в связывании пищевых антигенов в кишечнике. В сыворотке крови иммуноглобулин А существует в мономерных, димерных и тримерных формах, тогда как в секретах организма он существует исключительно в димерной форме с дополнительной цепью (секреторный компонент). Повышенные уровни поликлонального иммуноглобулина А могут наблюдаться при хронических заболеваниях печени, хронических инфекциях, аутоиммунных нарушениях (ревматоидном артрите, системной красной волчанке), саркоидозе и синдроме Вискотта-Олдрича. Уровень моноклонального иммуноглобулина А повышается при IgA-миеломе. Снижение синтеза иммуноглобулина А наблюдается при приобретенных и врожденных иммунодефицитных заболеваниях, таких как агаммаглобулинемия Брутона. Понижение уровня иммуноглобулина А может быть вызвано экссудативными гастроэнтеропатиями и потерей иммуноглобулина А через кожу при ожогах. Из-за замедленной скорости синтеза иммуноглобулина А его концентрация в сыворотке крови у младенцев ниже, чем у взрослых. Использование

специфических антител для количественного определения сывороточных белков стало ценным диагностическим инструментом. Светорассеивающие свойства скоплений антиген/антитело впервые наблюдались Pope и Healey в 1938 г. и были позже подтверждены Gitlin и Edelhoeh. Ричи (Ritchie) воспользовался турбидиметрическими методами измерений, чтобы провести количественное определение специфических белков. Количественное определение иммуноглобулинов можно также выполнить с использованием нефелометрических методик. Увеличение скорости полимеризации в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) с целью повышения чувствительности и увеличения скорости формирования комплексов антиген/антитело было описано Лизана (Lizana) и Хеллсингом (Hellsing). Тест Roche IgA основан на принципе иммунологической агглютинации. Помимо тест-системы для стандартного применения (IGA-2) была разработана тест-система повышенной чувствительности (IGAP2), предназначенная для количественного определения низких концентраций IgA, например, в образцах, полученных у детей. Известно, что так называемые парапротеины, выделяемые при моноклональных гаммапатиях (моноклональная иммуноглобулинемия), могут отличаться от соответствующих иммуноглобулинов поликлонального происхождения по аминокислотному составу и размеру. Эта особенность может нарушить связываемость с антителами и, следовательно, снизить точность количественного определения [126, 127].

**Принцип метода:** Иммунотурбидиметрический анализ.

Анти-IgA антитела реагируют с антигеном с формированием комплекса антиген/антитело. После агглютинации результат измеряется турбидиметрически. Добавление полиэтиленгликоля позволяет реакции быстро достичь конечной точки, повышает чувствительность и снижает риск получения ложноотрицательных результатов в образцах, содержащих избыток антигена.

**Реагенты - рабочие растворы:**

**R1** ТРИС-буфер: 20 ммоль/л, pH 8.0; NaCl: 200 ммоль/л; полиэтиленгликоль: 3.6 %; консервант; стабилизаторы.

**R3** Антитела козы против IgA человека: разного титра; ТРИС-буфер: 20 ммоль/л, pH 8.0; NaCl: 150 ммоль/л; консервант R1 находится в позиции В, R3 – в позиции С.

### **Определение иммуноглобулина Е**

**Назначение:** иммуноанализ с целью *in vitro* количественного определения содержания иммуноглобулина Е в человеческой сыворотке крови и плазме. Определение общего содержания IgE может помочь при диагностике аллергических заболеваний. Электрохемилюминесцентный иммунотест ЕСLIA предназначен для использования на иммунохимических анализаторах Elecsys и cobas e.

**Теоретическое обоснование.** Иммуноглобулин Е (IgE) играет важную роль в иммунной защите от паразитических инфекций и в развитии аллергических реакций (гиперчувствительность 1 типа). Гиперчувствительность 1 типа характеризуется развитием аллергических реакций сразу же после контакта с вызывающим аллергию антигеном (аллергеном). Связывание аллергена с сен-

сублимированными тучными клетками или базофилами ведет к перекрестному связыванию IgE с клеточной мембраной. Это, в свою очередь, вызывает дегрануляцию клеток и высвобождение факторов (например, гистамина), которые провоцируют появление типичных симптомов гиперчувствительности 1 типа. Концентрация IgE в сыворотке крови обычно очень низкая (< 0.001 % от общего сывороточного иммуноглобулина). Концентрация IgE зависит от возраста, самые низкие показатели наблюдаются при рождении. Его концентрация постепенно повышается и стабилизируется к 5-7 годам, однако значения IgE сильно различаются в конкретных возрастных группах. У новорожденных и маленьких детей с рецидивирующими заболеваниями дыхательных путей определение IgE имеет большое значение для прогноза течения заболевания. IgE играет важную роль при аллергиях, повышенная концентрация IgE может наблюдаться у пациентов с такими аллергическими заболеваниями как сенная лихорадка, атопический бронхит и дерматит. Однако нормальные показатели IgE не говорят о том, что аллергические заболевания можно исключить. По этой причине количественное определение концентрации IgE в сыворотке крови может быть использовано для клинической дифференциации между атопическими и неатопическими заболеваниями только в сочетании с другими количественными показателями. Повышенная концентрация IgE в сыворотке может также наблюдаться при неаллергических заболеваниях, например, при бронхолегочном аспергиллезе, синдроме Вискотта-Олдрича, гипер-IgE синдром, IgE-миеломе и паразитических инфекциях. В тест-системе Elecsys IgE II используются моноклональные антитела, специфично направленные против иммуноглобулина E человека [125, 128].

#### **Принцип метода**

Принцип «сэндвича». Общая продолжительность анализа: 18 минут

- 1-я инкубация: IgE в образце (10 мкл), биотинилированное моноклональное IgE-специфичное антитело и моноклональное IgE-специфичное антитело, меченое рутениевым комплексом), вступают в реакцию с формированием сэндвич-комплекса.
- 2-я инкубация: После добавления микрочастиц, покрытых стрептавидином, образовавшийся комплекс связывается с твердой фазой посредством взаимодействия биотина и стрептавидина.
- Реакционная смесь аспирируется в измерительную ячейку, где микрочастицы оседают на поверхность электрода в результате магнитного взаимодействия. Затем с помощью ProCell/ProCell M удаляются не связавшиеся вещества. После этого приложенное к электроду напряжение вызывает хемилюминесцентную эмиссию, которая измеряется фото умножителем.
- Результаты определяются с помощью 2-точечной калибровочной кривой, полученной для данного инструмента, и референсной калибровочной кривой, данные которой сообщены в штрих-коде набора реагентов.

#### **Реагенты - рабочие растворы**

**M** Микрочастицы, покрытые стрептавидином (прозрачная крышка), 1 флакон, 6.5 мл: микрочастицы, покрытые стрептавидином, 0.72 мг/мл; консервант.

**R1** Анти-IgE-антитело~биотин (серая крышка), 1 флакон, 10 мл: биотинилированные моноклональные анти-IgE-антитела (мыши) 2.5 мг/л; фосфатный буфер 85 ммоль/л, pH 6.5; консервант.

**R2** Анти-IgE-антитело~Ru(bpy) (черная крышка), 1 флакон, 10 мл: моноклональные анти-IgE антитела (мыши), меченые рутениевым комплексом 5.5 мг/л; фосфатный буфер 85 ммоль/л, pH 6.5; консервант.

### Определение иммуноглобулина G

**Назначение:** в тесте пробирке для количественного определения IgG в человеческой сыворотке, плазме, цереброспинальной жидкости и мочи на Roche / Hitachi Cobas гр систем.

**Теоретическое обоснование.** IgG, молекулы состоят из двух легких цепей (каппа или лямбда) и двух тяжелых цепей гамма. Примерно 80% сывороточного иммуноглобулина IgG; его основными задачами являются защита от микроорганизмов, прямой нейтрализации токсинов и индукции фиксации комплексов. IgG является единственным иммуноглобулином, который может пересечь плацентарный барьер и обеспечивают пассивную иммунную защиту для плода и новорожденного. Эта материнская защита постепенно снижается до собственной иммунологической системы ребенка начинает развиваться (около шести месяцев). Уровни в сыворотке / плазме достигаются через 18 месяцев, как у взрослых. Поликлональные IgG повышение в сыворотке / плазме, могут присутствовать при системной красной волчанке, хронических заболеваниях печени (инфекционный гепатит и цирроз Лаэннека), инфекционные заболевания и кистозный фиброз. Моноклональные IgG увеличиваются при IgG-миеломе. Снижение синтеза IgG обнаруживается при врожденных и приобретенных иммунодефицитах и селективных дефицитах подкласса IgG, такие как агаммаглобулинемия типа Брутона. Снижение концентрации IgG в сыворотке и плазме крови наблюдаются с потерей белка энтеропатиями, нефротическим синдромом. Увеличение IgG метаболизма обнаруживается при синдроме Вискотта-Олдрича, миотонической дистрофии. Определение IgG в цереброспинальной жидкости (CSF) используется для оценки инфекций, связанных с центральной нервной системы (ЦНС), новообразованиях или первичных неврологических заболеваниях (в частности, рассеянного склероза). Анализ Роше IgG основан на принципе иммунологической агглютинации. В дополнение к стандартному приложению (IGG-2), есть чувствительные приложения (IGGC2 и IGGU2), предназначенные для количественного определения IgG в ликворе и моче. Известно, что так называемые парапротеины секретируемые в моноклональными gammopathies (моноклональный immunoglobulinemia), могут отличаться от соответствующих иммуноглобулины поликлональных происхождения по составу и размеру аминокислот. Это может привести к нарушению связывания с антигеном и, следовательно, ухудшает возможность точно оценить [126, 128].

**Принцип метода:** Иммунотурбидиметрический анализ. Анти-IgG антитела реагируют с антигеном в образце с образованием комплекса антиген / антитело.



Добавление ПЭГ позволяет реакции быстро прогрессировать до конечной точки, повышает чувствительность, а также снижает риск образцов, содержащих избыток антигена продуцирующего ложно отрицательных результатов.

#### **Реагенты - рабочие растворы**

**R1** TRIS буфер: 20 ммоль / л, pH 8,0; NaCl: 200 ммоль / л; полиэтиленгликоль: 3,6%; консервант; стабилизаторы.

**R2** IgG антитела (козий): в зависимости от титра; TRIS буфер: 20 ммоль / л, pH 8,0; NaCl: 150 ммоль / л; консервант R 1 находится в положении В и R2 находится в положении С.

### **2.5.2 Определение содержания клеток периферической крови**

Требования к обеспечению выполнения технологии.

Лабораторное оборудование: автоматический гематологический анализатор SysmexKX-21, ротамикс RM1-L, микроскоп бинокулярный с иммерсией и встроенным осветителем LeicaDM1000, счетчик лейкоцитарной формулы крови СЛФ-ЭЦ-01-09, автоматический анализатор СОЭ SRS 20/II, модуль окрашивания мазков Hematek Slide Stainer.

Реагенты, реактивы: Диолент CELLPACK, WBC/RBC лизирующий раствор STROMATOLYSER-WH, детергент CELLCLEAN, набор реагентов для автоматической окраски препаратов крови и костного мозга (НПФ Арбис+)

Прочий расходуемый материал: масло иммерсионное, предметные стекла, шпатель для приготовления мазков крови Flexi-strip, вакуумная система для забора крови BDVacutainerK2E, вакуумная система для забора крови Vacuette 4NCESRsodiumcitrate, перчатки медицинские, дезинфицирующее средство «Мелисептол», спирт медицинский 70%, дозатор автоматический 20-200 мкл, наконечники для автоматического дозатора, штативы для предметных стекол, буферная смесь для гематологических исследований (производства НПФ «Абрис+»), штативы для предметных стекол, штативы пластиковые для пробирок, марля, вода дистиллированная, бумага фильтровальная, цилиндры мерные вместимостью 25-1000 мл, таймер.

Требования к технологии выполнения исследования (работ).

Взятие образца: для общего анализа крови используется венозная кровь. Забор крови производится с использованием вакуумной системы BDVacutainer K2E, для определения СОЭ используются система для забора крови Vacuette 4NCESRsodiumcitrate . Пробы крови доставляются в течении 1 часа в лабораторию при соблюдении температурного режима 2-8 °С . Технология взятия и требования к преаналитическому этапу согласно ГОСТ Р 53079.4 – 2008. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа.

Этапы клинического исследования крови:

1. Выполнение исследования на гематологическом анализаторе (показатели: количество лейкоцитов (WBC), количество эритроцитов (RBC), концентрация гемоглобина (HGB), гематокрит (HCT), количество тромбоцитов (PLT), средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритро-

цитах (MCH), средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), показатель гетерогенности эритроцитов по объему (RDW-CV, RDW-SD), взвешенное распределение тромбоцитов (PDW), средний объем тромбоцита (MPV), отношение (%) объема крупных тромбоцитов ко всему объему тромбоцитов (P-LCR)): образцы помещаются в ротамикс для перемешивания пробы в течении 3-5 минут. С помощью сканера с пробирки считывается штрих-код. Порядок проведения аналитической процедуры на гематологическом анализаторе см. «Руководство пользователя автоматического гематологического анализатора SysmexКХ-21» п. 2.4.1.

2. После аспирации образца анализатором на предметное стекло с помощью дозатора наносится 10 мкл крови и с помощью шпателя готовится мазок крови. Приготовление и покраска мазков см. Руководство по эксплуатации модуля окрашивания мазков HematekSlideStainer.

3. Установка пробирок для определения СОЭ по методу Вестергрена в автоматический анализатор СОЭ SRS20/II.

- Подсчет лейкоцитарной формулы в мазке производится с помощью бинокулярного микроскопа Leica и счетчика лейкоцитарной формулы крови. Технологию подсчета см. С. А. Луговская и соавт. «Лабораторная гематология» «Морфологическое исследование мазков крови». Лейкоцитарная формула записывается в виде лейкограммы на бланк распечатки результатов анализа, выполненного на гематологическом анализаторе.

- Показатели исследования, выполненные на гематологическом анализаторе, переносятся в электронную форму бланка ответа автоматически. Лейкограмма с указанием особенностей морфологии эритроцитов и лейкоцитов и СОЭ вносятся вручную, проверяются врачом лабораторной диагностики, утверждаются и отправляются в регистратуру медицинского центра. Бланк распечатки результатов общего анализа крови с гематологического анализатора клеивается в бумажный журнал регистрации исследований общего анализа крови.

### **2.5.3 Определение субпопуляций лейкоцитов и экспрессия функциональных молекул**

#### **Технология определения наивных В клеток.**

В клеток памяти и функционально незрелых В лимфоцитов проводилась на проточном цитофлуориметре (FACSCantoII, Becton Diskinson), обработка полученных данных осуществлялась в пакете прикладных программ.

**Технология определения:** для определения поверхностного иммунофенотипа В-лимфоцитов мононуклеары периферической крови выделяли на градиенте плотности Фиколл-Пака (Pharmacia, Sweden), отмывали в фосфатном буфере (PBS + 0,1% Sodium Azide), инкубировали 15 минут в питательной среде RPMI-1640 при 37 °С. В 500 мкл клетки осаждали и окрашивали моноклональными антителами, конъюгированными FITC, PE, PC-5, PC7 (Becton & Dickinson, Beckman Coulter, USA).

Первые ворота проточного цитофлуориметра (FACSCantoII, Becton Diskinson) выставались по рассеянию света: прямом светорассеянии (forward

scattering или FSC); рассеянии света на угол  $90^\circ$ , т.н. боковое светорассеяние (side scattering или SSC). Параметры светорассеяния позволяют проводить разделение клеток по размерам, форме, состоянию клеточной мембраны и характеристикам цитоплазмы. Мы выделяли лимфоциты CD45+CD14-. В следующей пробе первым выставляли ворота по позитивности метки, распределение популяций видно по интенсивности свечения маркера в популяции (рисунок 2).

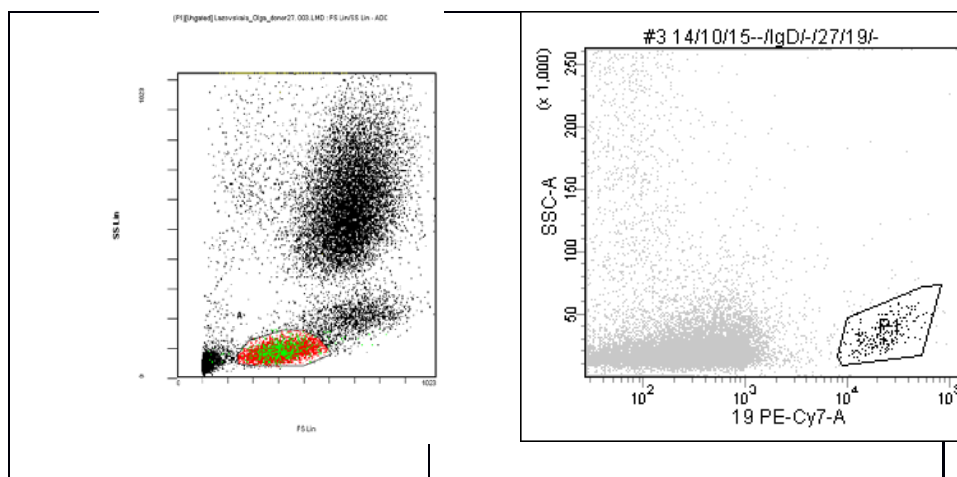


Рисунок 2 - Пример выделения ворот для определения субпопуляций В-лимфоцитов

Следующим шагом являлось выставление ворот по третьей метке в данной пробе (в нашем случае по В лимфоцитам CD19+/SSC) и анализ популяций по маркерам CD27+/- и IgD+/- на CD19+ клетках.

На рисунке 2 нижний правый квадрат - CD27+IgD-CD19+ изотип-переключенные В клетки памяти, имеющие наибольшую диагностическую значимость. Верхний правый квадрат - CD27+IgD+CD19+ не переключенные В клетки памяти; верхний левый квадрат - CD27-IgD+CD19+ наивные В лимфоциты.

Редукция В клеток памяти у пациентов с ПИД часто сопровождается экспансией функционально незрелых В лимфоцитов CD19+CD21-low, которых у здоровых детей не должно быть больше 9% от В лимфоцитов. Поэтому мы анализировали такую популяцию В лимфоцитов в группе пациентов и в группе здоровых детей.

Анализ проводился также по двойному выставлению ворот и выставлению ворот по позитивным и негативным популяциям и анализ маркера CD21 на популяции CD19+ (рисунок 3, 4).

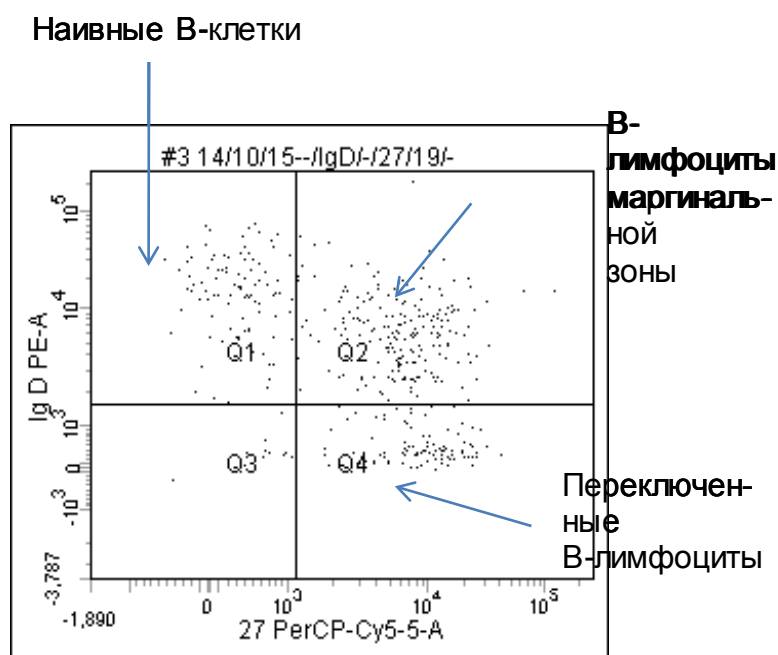


Рисунок 3 - Пример определения изотип-переключенные В клетки памяти

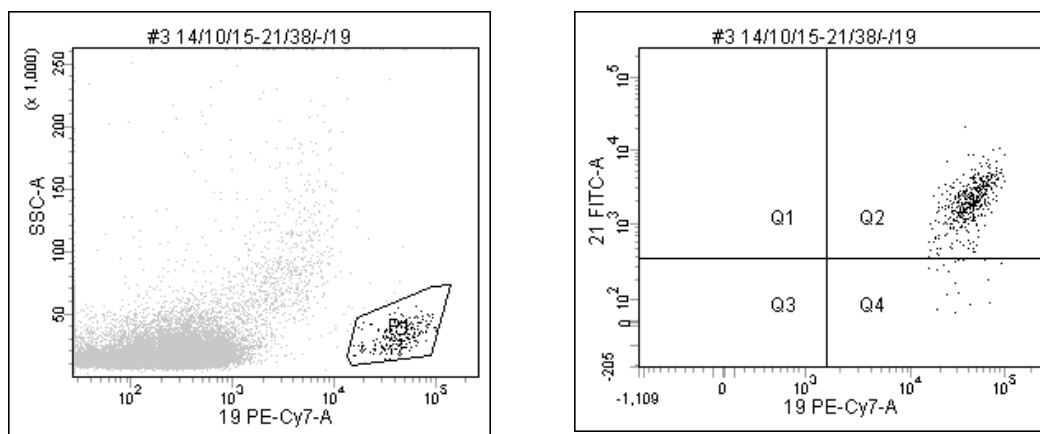


Рисунок 4 – Пример определения функционально незрелых В лимфоцитов CD19+CD21-

В квадрате CD19+CD21+ выделялась популяция с низким уровнем экспрессии CD21 - CD19+CD21<sup>low</sup>, анализ данной популяции проводился путем вычитания от CD19+CD21+ клеток с фенотипом CD19+CD21<sup>high</sup> в процентном и абсолютном подсчете.

#### **Технология определения наивных Т-лимфоцитов.**

Т-клеток памяти проводилась на проточном цитофлуориметре (FACSCantoII, Becton Dickinson), обработка полученных данных осуществлялась в пакете прикладных программ.

**Технология определения:** в своем исследовании мы определяли методом проточной цитометрии наивные Т-хелперы (CD4+CD45RA<sup>+</sup>), Т-хелперы памя-

ти (CD4+CD45RO+), наивные цитотоксические Т-лимфоциты (CD8+CD45RA+) и цитотоксические Т-клетки памяти (CD8+CD45RO+). Анализ результатов проводился по двойному выставлению ворот с использованием общего маркера Т-лимфоцитов CD3.

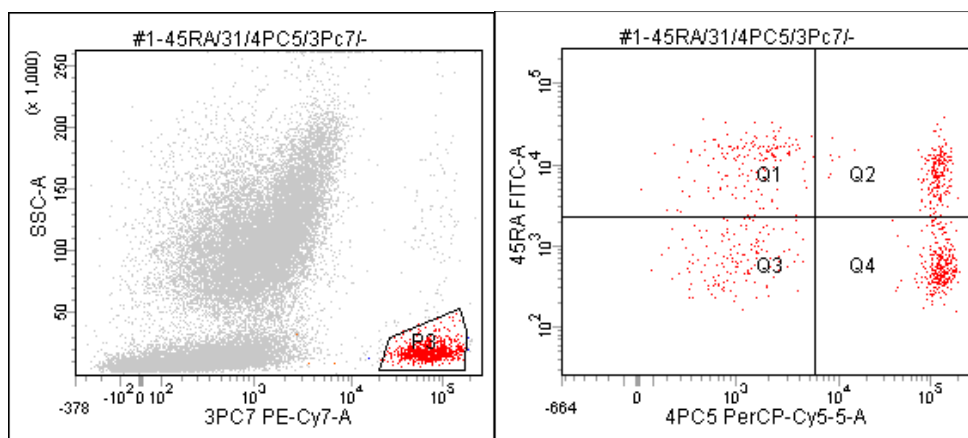


Рисунок 5 – Пример определения методом проточной цитометрии наивные Т-хелперы (CD4+CD45RA+), Т-хелперы памяти (CD4+CD45RO+), наивные цитотоксические Т-лимфоциты (CD8+CD45RA+) и цитотоксические Т-клетки памяти (CD8+CD45RO+)

### Панель углубленного иммунологического исследования у пациентов с ОВИН:

1. Иммунофенотипическое исследование Т-лимфоцитов в цельной крови.

Иммунологические параметры для исследования состояния иммунной системы включали в себя следующие показатели клеточного иммунитета:

- стандартное иммунологическое исследование: Т-лимфоциты (CD3+), Т-хелперы (CD3+CD4+), цитотоксические Т-клетки (CD3+CD8+), В-лимфоциты (CD19+), натуральные киллеры (CD3-CD16+CD56+).

- дополнительное исследование: тимические мигранты (CD3+CD4+CD31+CD45RA+), наивные Т-хелперы (CD3+CD4+CD45RA+), Т-хелперы памяти (CD3+CD4+CD45RO+), наивные CD8+ Т-лимфоциты (CD3+CD8+CD45RA+), CD8+ памяти (CD3+CD8+CD45RO+), регуляторные Т-лимфоциты (CD4+CD25+CD127-), дважды негативные Т-лимфоциты (CD3+CD4-CD8-TCRαβ+).

2. Иммунофенотипическое исследование В-лимфоцитов.

Для определения поверхностного иммунофенотипа В-лимфоцитов мононуклеары периферической крови выделяли на градиенте плотности Фиколл-Пака (Pharmacia, Sweden), отмывали в фосфатном буфере (PBS + 0,1% Sodium Azide), инкубировали 15 минут в питательной среде RPMI-1640 при 37 °C. Затем клетки осаждали и окрашивали моноклональными антителами, конъюгированными FITC, PE, PC-5, PC7 (Becton & Dickinson, Beckman Coulter, USA).

Иммунологические параметры для углубленного определения В-лимфоцитов включали в себя следующие маркеры:

- IgD-переключенные В-лимфоциты памяти (CD19+CD27+IgD-), IgD-непереключенные В-лимфоциты памяти или В-лимфоциты маргинальной зоны (CD19+CD27+IgD+), наивные IgD+ В-лимфоциты (CD19+CD27-IgD+), IgM-переключенные В-лимфоциты памяти (CD19+CD27+IgM-), IgM-непереключенные В-лимфоциты памяти или В-лимфоциты маргинальной зоны (CD19+CD27+IgM+), наивные IgM+ В-лимфоциты (CD19+CD27-IgM+), функционально-незрелые В-лимфоциты (CD19+CD21-, CD19+CD21-CD38-, CD19+CD21-CD38++), регуляторные В-лимфоциты (CD20+CD5+, CD19+CD24++CD38++, CD19+CD38++IgM++).

## **2.6 Количественное определения молекул ДНК TREC и KREC в сухих пятнах крови**

### **2.6.1 Выделение ДНК из крови щелочным буфером для анализа TREC и KREC**

Приготовление необходимых буферных растворов, состав однократного щелочного буфера: 15mMTrisHClpH 11.5, 10mMKCl, 10mMKOH.

Выделение ДНК из бумажек, пропитанных кровью:

1. Берется 1 кусочек бумажки, пропитанной кровью, размером 1.5\*1.5 мм, поместить в пробирку, добавить 80 мкл однократного щелочного буфера, перемешивается до полного погружения бумаги в раствор.

2. Инкубировать в термостате при 95°C 15 мин. (Крышка должна быть плотно закрыта, пробирка может открыться вследствие нагрева, иногда с разбрызгиванием содержимого. Не допускайте этого процесса). При активном испарении в процессе инкубации сбрасывать капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

3. Охладить пробирки, (можно просто на столе при комнатной температуре), центрифугировать их 3 мин при 16000g (14 тыс. об/мин или при максимальной скорости на центрифуге Eppendorf).

4. Не задевая осадок перенести супернатант, содержащий ДНК, в новую пробирку. Хранить при -10-20°C до постановки ПЦР.

### **2.6.2 Количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в сухих пятнах крови методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени**

Работа проводилась согласно инструкции T&B-тест, по применению набора реагентов для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в сухих пятнах крови методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Набор реагентов предназначен для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в сухих пятнах крови на фильтровальной бумаге с це-

лью оценки функциональной активности тимуса и скрининга и дифференциальной диагностики иммунодефицитных состояний (ИДС).

Молекулы TREC и KREC – стабильные кольцевые фрагменты ДНК, образующиеся в ходе перестройки генов рецепторов Т- и В-клеток, соответственно. У здоровых новорожденных и далее в течении жизни молекулы TREC и KREC образуются в больших количествах соответственно возрастным нормам, в то время как у детей с ТКИН и агаммаглобулинемией количество TREC и KREC находятся на недетектируемом уровне. Анализ может быть проведен как с использованием цельной крови, так и с ДНК, полученной из сухих пятен крови, собираемых в ходе национальной программы скрининга новорожденных.

Количественное определение содержания копий TREC и KREC в образце методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя этапы: экстракцию ДНК из образцов цельной крови или сухих пятен крови на фильтровальной бумаге, амплификацию участков молекул TREC и KREC с одновременной гибридизационно-флуоресцентной детекцией. В ходе ПЦР также происходит амплификации участка гена человека IL17RA (эндогенный внутренний контроль). Эндогенный внутренний контроль позволяет контролировать этапы экстракции ДНК и проведения ПЦР, отсутствие в образце ингибиторов ПЦР, оценивать адекватность взятия и количество материала. С учетом эндогенного контроля происходит пересчет количеств копий TREC и KREC в исходном образце.

Результаты исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для контрольных образцов (калибраторы, отрицательный контроль экстракции и отрицательный контроль ПЦР (К-)).

Количество копий TREC (KREC) рассчитывается на 10<sup>5</sup> ядер-содержащих клеток (лейкоцитов) с учетом внутреннего контроля IL17RA по формуле:

Количество TREC (KREC) = (кол-во копий TREC (KREC) на мл / кол-во копий IL17RA)\*200000

## **2.7 Анкетирование**

В ходе исследования проводилось анкетирование пациентов специально разработанной анкетой, состоящей из 10 вопросов, на основании 10 признаков первичных иммунодефицитов, разработанных Curing P. I. Worldwide, Jeffrey Modell Foundation, с изменениями, адаптированными для ОВИН, с целью первичного отбора на приеме у педиатра, иммунолога-аллерголога (Приложение 3).

Согласно разработанному плану работы на 2015 год, проведены исследования в Алматинской, Карагандинской, Западно-Казахстанской, Мангыстауской и Атырауской областях.

## **2.8 Методы статистической обработки**

Статистическая обработка полученных данных производилась на персональном компьютере с использованием пакета статистических программ «Microsoft Office Excel 2010», «Statistica 6.0». Обработка результатов исследо-

вания проводилась методом непараметрической статистики. В случае если распределение признака принималось приближенно нормальным, результаты представлялись в виде  $(M \pm m)$ , где  $M$  – среднее арифметическое значение,  $m$  – стандартная ошибка среднего значения. С целью проверки гипотезы о различии средних для двух сравниваемых групп и признаков определялись методом Стьюдента с вычислением  $t$ -критерия. За уровень статистической значимости различий показателей принималась величина  $p < 0,05$ .



### **3 ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫЯВЛЯЕМОСТИ И ОСОБЕННОСТЕЙ ТЕЧЕНИЯ ОБЩЕГО ВАРИАБЕЛЬНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА У ПАЦИЕНТОВ РАЗЛИЧНОЙ ВОЗРАСТНОЙ КАТЕГОРИИ**

Результаты клинического, эпидемиологического, контролируемого, открытого исследования о выявляемости пациентов с ОВИН в различных возрастных категориях, особенности диагностики данной патологии.

ОВИН относится к группе гетерогенных, полисиндромных заболеваний, который манифестирует на фоне несостоятельности антител продуцирующей функции В-клеточного звена иммунитета, поэтому и наблюдается значительное понижение уровней сывороточных иммуноглобулинов классов G, M, A, а также нарушение продукции специфических антител [125]. Ранее проведенные исследования указывают на заинтересованность в развитии ОВИН дефектов Т-клеточной иммунорегуляции. ОВИН характеризуется высокой частотой встречаемости в популяции (5:1000 000 – 100:1000 000) [126, 127], не имеет гендерных различий, а также отличительным признаком является поздняя манифестация, во вторую-третью декаду жизни [128, 129]. Наиболее частыми клиническими проявлениями ОВИН являются частые рецидивирующие синопульмональные инфекции, преимущественно бактериальной этиологии (*H. Influenzae*, *Str. pneumoniae*, *Mycoplasmaspp*) [25], а также наблюдается развитие осложнений со стороны гастроинтестинального тракта, различных аутоиммунных реакций, спленомегалии, гранулематозных и опухолевых процессов [25, 130]. На сегодняшний день не до конца изучены этиология и патогенез ОВИН.

Среди существующих классификаций ОВИН на сегодняшний день наиболее универсальной, основанной как на патогенетических механизмах, так и на разнообразии клинических проявлений патологии, является классификация Европейского общества по изучению иммунодефицитов. Согласно результатам проточной цитометрии выделяют два типа ОВИН: тип А (В-), недифференцированный, при котором определяется менее 1% циркулирующих В-лимфоцитов; тип В (В+), при котором определяется более 1% циркулирующих В-лимфоцитов. Внутри В типа выделяются субклассы а и b, а субкласс b, в свою очередь, делится на субклассы I и II. Данное разделение основано на уровнях экспрессии кластеров дифференцировки CD21+ , CD27+ , и CD38+ и соответствующем им риске развития спленомегалии, гранулематозной болезни и лимфоаденопатии [131, 132].

В нашем исследовании мы показали особенности клинического течения и иммунологических показателей пациентов с установленным диагнозом ОВИН, а также частоту выявляемости ОВИН у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, с лимфомами и лейкозами, туберкулезом легких. Разработали алгоритм диагностики пациентов с общей вариабельной недостаточностью.

### **3.1 ИССЛЕДОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ТЕЧЕНИЯ ОБЩЕЙ ВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ РАЗЛИЧНОЙ ВОЗРАСТНОЙ КАТЕГОРИИ С УСТАНОВЛЕННЫМ ДИАГНОЗОМ**

В исследование были включены 30 пациентов с диагнозом ОВИН, которые были отобраны в результате проведенного на базе АО «Республиканский диагностический центр» и областных больниц, поликлиник Алматинской, Карагандинской, Западно-Казахстанской, Мангыстауской и Атырауской областей. А также в ходе исследования проводился отбор пациентов, с подозрением на общий переменный иммунодефицит, на базах Национального научного центра материнства и детства (отделение ревматологии), ГККП «Противотуберкулезный диспансер», Центр трансплантологии и онкологии г. Астаны (отделение онкогематологии) с 2014 по 2016 гг. Окончательная верификация диагноза была проведена на базе АО «Республиканский диагностический центр».

Общая переменная иммунная недостаточность составляет 27,66% от общего числа Первичных иммунодефицитов зарегистрированных в национальном реестре РК. Срок между первыми клиническими проявлениями заболевания и выставленным окончательным диагнозом колебался в диапазоне от 1 года до 16 лет.

#### **Критерии включения в исследование:**

- ❖ Пациенты в возрасте от 2 до 55 лет, без гендерного различия.
- ❖ Пациенты с наличием рецидивирующего тяжелого инфекционного синдрома, аутоиммунных заболеваний, онкологических заболеваний.
- ❖ Пациенты с уровнем иммуноглобулина G не более 2 г/л у детей в возрасте от 2 до 7 лет и не более 4 г/л.
- ❖ Пациенты с уровнем иммуноглобулина не более 7 г/л при наличии подтвержденного аутоиммунного заболевания, онкогематологического заболевания и инфекционного синдрома в обострении.
- ❖ Пациенты со сниженными предикторами В-лимфоцитами (изотип-переключенные В-лимфоциты памяти (IgM-IgD-CD27+))

#### **Критерии исключения в исследование:**

- ❖ Дети до 2 лет, взрослые старше 55 лет.
- ❖ При исключении других заболеваний с потерей белка (нефропатий, энтеропатий, голоданием и др) и других первичных иммунодефицитных состояний.

С целью выявления пациентов с ОВИН, было обследовано 258 пациентов с различными нозологиями: рецидивирующие респираторные заболевания – 153 пациента, с аутоиммунными заболеваниями – 22 пациента, с онкогематологическими заболеваниями – 41 пациент, с туберкулезом легких – 42.

Таблица 2 – Общая характеристика обследованных пациентов, включенных в исследование

Группа заболеваний	Количество, обследованных	Количество, выявленных с ОВИН	%
Инфекционные заболевания	153	13	5,03%
Аутоиммунные заболевания	22	3	1,16%
Онкогематологические заболевания	41	9	3,49%
Туберкулез легких	42	5	1,94%
<b>ИТОГО</b>	<b>258</b>	<b>30</b>	<b>11,62%</b>

Были получены следующие результаты: общее количество пациентов с ОВИН составило - 30, среди которых 13 (5,03%) - с инфекционными заболеваниями, 3 (1,16%) - с аутоиммунными заболеваниями, 9 (3,49%) – с онкогематологическими заболеваниями, 5(1,94%) – с туберкулезом легких (рисунок 6).



Рисунок 6 – Характеристика пациентов с ОВИН

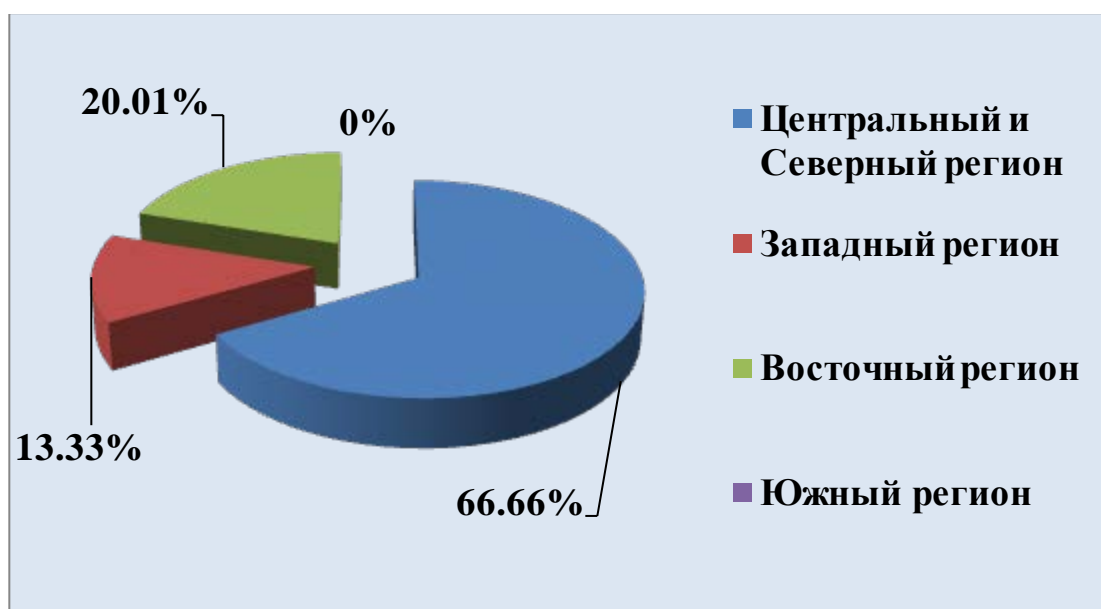


Рисунок 7 - Структура распределение зарегистрированных больных с ОВИН, учитывая территориальную принадлежность (2016 год)

В представленной диаграмме, отображены данные территориальной принадлежности пациентов с ОВИН, зарегистрированных в Республиканском реестре больных с ПИД на 2016 год. Анализ результатов показал, что на 2016 год в Центральном и Северном регионе было зарегистрировано наибольшее количество пациентов с ОВИН - 20 (66,66%), в Восточном регионе — 6 пациентов (20,01%), в Западном регионе — 4 пациента (13,33%), в Южном регионе не было зарегистрированных случаев пациентов с ОВИН, что свидетельствует о недостаточной диагностике данного заболевания.

Согласно полученным данным, возраст дебюта заболевания колебался от 2-40 лет (19,53 лет), пик заболеваемости приходился на период от 20 до 30 лет. Анализируя карты пациентов с ОВИН, можно выделить два пика манифестации данного заболевания: 1-й - от 5 до 10 лет, 2-й - от 20 до 30 лет. Также было установлено, что продолжительность периода от начала клинических симптомов заболевания до установления диагноза ОВИН у пациентов составила от 1 года до 16 лет. В ряде случаев это свидетельствовало о гиподиагностике данного патологического состояния (таблица 3).

Таблица 3 - Диспансерная группа пациентов с ОВИН

Диагноз	Число больных		Возраст дебюта заболевания у пациентов с ОВИН (средний возраст)	Продолжительность периода до установления диагноза ОВИН (средняя)
	М	Ж		
Общая переменная иммунная недостаточность (ОВИН)	15	15	2 – 40 (19,53)	1 — 16 (30)

Таблица 4 - Характеристика пациентов с ОВИН, включенных в исследование

Диагноз	Число больных		Мужской пол		Женский пол	
	N	%	N	%	N	%
Общий переменный иммунодефицит	30	100,0	15	50	15	50
ВСЕГО	30	100,0	15	50	15	50

При анализе распределения больных с ОВИН по половому признаку выявлено, что 50% пациентов, включенных в исследование мужского пола, 50% - женского пола. Из всех больных, находившихся под наблюдением, лица мужского пола составили 15 человек, женского пола – 15. Таким образом, был сделан вывод, что соотношение лиц мужского и женского пола было одинаковым (таблица 4).

Таблица 5 - Характеристика контрольной группы, включенной в исследование

Диагноз	Число больных		Мужской пол		Женский пол	
	N	%	n	%	N	%
Контрольная группа	20	100,0	10	50	10	50
ВСЕГО	20	100,0	10	50	10	50

При анализе распределения в контрольной группе по половому признаку выявлено, что 50% пациентов, включенных в исследование мужского пола, 50% - женского пола. Из всех, включенных в контрольную группу, лица мужского пола составили 10 человек, женского пола – 10. Таким образом, наблюдается одинаковое соотношение по половому признаку (таблица 5).

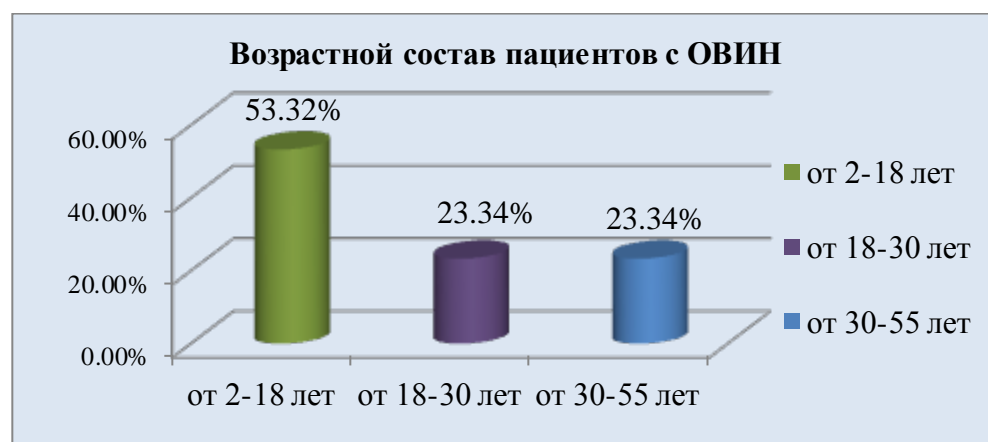


Рисунок 8 - Структура возрастного состава пациентов с ОВИН

Анализируя структуру возрастного состава пациентов с ОВИН, получены следующие данные: наиболее часто ОВИН встречался в возрастной группе от 2 до 18 лет у 16 пациентов, что составило 53,32%, в возрастной группе от 18 до 30 лет у 7 пациентов (23,34%) и у 7 пациентов (23,34%) в возрастной группе от 30 до 55 лет (рисунок 8).

Таким образом, анализ структуры возрастного состава показал, что ОВИН у обследованных пациентов наиболее часто встречалась в возрастной группе от 2 до 18 лет (53,32%), без гендерного различия.

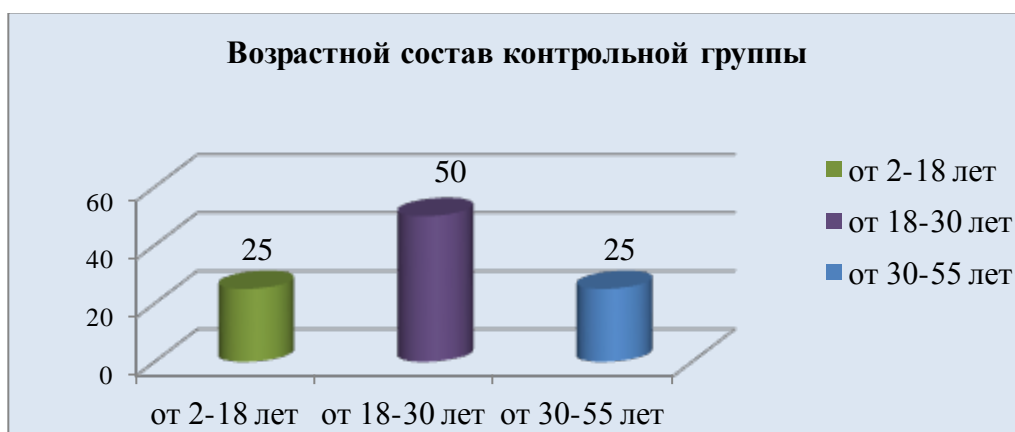


Рисунок 9 - Структура возрастного состава контрольной группы

Анализируя структуру возрастного состава контрольной группы, получены следующие данные (рисунок 9), от 2 до 18 лет у 5 человек (25%), 18-30 лет у 10 (50%) и 5 человек (25%) в возрасте 30-55 лет.

Известно, что наиболее частыми клиническими проявлениями у пациентов с ОВИН являются инфекции респираторного тракта. Повышенная заболеваемость бактериальными инфекциями, поражающие слизистые оболочки верхних и нижних дыхательных путей встречается и у более 90% пациентов, и, в меньшей степени, желудочно-кишечный тракт. Часто обнаруживаемыми патогенами были пневмококк, гемофильная инфекция, золотистый стафилококк и *Moraxella catharralis* [36].

Проведенные собственные исследования показали, что в структуре заболеваемости у пациентов с ОВИН, преобладали инфекции респираторного тракта (повторяющиеся синуситы, бронхиты и пневмонии), часто обусловленные оппортунистическими инфекциями (таблица 6).

Согласно, представленным в таблице данным, респираторные инфекции верхних и нижних дыхательных путей составили от 10% до 90% (хронические отиты, синуситы, риниты, пневмонии, бронхоэктатическая болезнь). Распространённость других нозологий, как острый лимфобластный лейкоз, ревматоидный артрит, неспецифический язвенный колит, диссеминированная форма туберкулеза легких составила от 3,33% до 30%.

Таблица 6 — Структура основных нозологий у пациентов с ОВИН

<b>Заболевание</b>	<b>Количество случаев</b>	<b>%</b>
Хронический синусит	27	90
Хронический отит	21	70
Хронический пансинусит	18	60
Хронический ринит	22	73,33
Пневмония	27	90
Бронхоэктатическая болезнь	10	33,33
Неспецифический язвенный колит	3	10
ХОБЛ	3	10
Бронхиальная астма	3	10
Атопический дерматит	1	3,33
Диссеминированная форма туберкулеза легких	5	16,67
Ревматоидный артрит	1	3,33
Аутоиммунная тромбоцитопения	2	6,67
Острый лимфобластный лейкоз	9	30

Установлено, что течение респираторных инфекций при ОВИН, как правило, сопровождается развитием тяжелых осложнений и отличается торпидностью к стандартным схемам терапии инфекции. Среди осложнений патологии органов дыхания чаще всего встречаются плевриты, пневмофиброзы, бронхоэктазы [34].

Таблица 7 — Структура основных осложнений у пациентов с ОВИН

<b>Осложнения</b>	<b>Количество случаев</b>	<b>%</b>
Пневмофиброз	20	66,67
Ателектаз	5	16,67
Плеврит	12	40
Гнойный эндофтальмит	1	3,33
Нейросенсорная тугоухость	7	23,33
Кишечные кровотечения	2	6,67

Результаты наших наблюдений показали, что наиболее распространенными осложнениями у пациентов с ОВИН были: пневмофиброз (66,67%), плеврит (40%), ателектаз (16,67%), нейросенсорная тугоухость (23,33%) и гнойный эндофтальмит (3,33%), частота встречаемости была от 6,67% до 66,67% при всех клинических случаях пациентов с ОВИН (таблица 7).

Известно, что иммунологические изменения при ОВИН проявляются снижением уровней циркулирующих иммуноглобулинов IgG, IgM и IgA и практически полным отсутствием специфических поствакцинальных антител или к изогемагглютинином. При этом, около 90% всех пациентов с ОВИН имеют

нормальное общее количество В-лимфоцитов в периферической крови и у 10% пациентов диагностируется снижение числа В-лимфоцитов (<1% от лимфоцитов), подтверждая тем самым ранний дефект дифференцировки в костном мозге, отсутствие необходимых факторов выживания на периферии или присутствие негативной регуляции [6].

Таблица 8 — Показатели иммуноглобулинов класса G, A, M в крови пациентов с ОВИН и контрольной группы

Показатель	Пациенты с ОВИН	Контрольная группа
	M±m	M±m
Ig G г\л	3,6± 0,4	9,5± 0,7
Ig M г\л	1,0±0,07	2,1±0,06
Ig A г\л	0,3±0,07	2,8±0,17
Возраст	19,53±15,90	22,4±11,99
Абсолютный показатель различия: p<0,05		

Согласно, представленной таблице, показатели основных иммуноглобулинов классов G, M, A в крови пациентов с ОВИН и контрольной группы, свидетельствуют о значимом различии показателей у пациентов с установленным диагнозом ОВИН в сравнении с контрольной группой. Показатели Ig G снижены в 3 раза, Ig M в 2 раза, Ig A в 8 раз по сравнению с данными показателями контрольной группы.

У пациентов с нормальным содержанием общего числа В-лимфоцитов выявляются нарушения, связанные с резким снижением или полным отсутствием «изотип-переключенных В-лимфоцитов памяти» (CD19+IgM-IgD-CD27+), что свидетельствует о нарушении в функционировании зародышевых (герминативных) центров [6].

Таблица 9 — Показатели иммунограммы в крови у пациентов с установленным диагнозом ОВИН и у контрольной группы

Показатель	Пациенты ОВИН	Контроль (здоровые люди)
	M±m	M±m
CD3+ %	59,35± 2,05*	70,1± 0,7
CD3+ DR+ %	8,1± 0,1	7,1± 0,4
DR от CD3	23,85± 2,15	10,1± 0,5
CD4+ %	27,5± 3,1	36,5± 0,9
CD8+ %	26,450± 4,55	27,9± 0,6
CD3-CD8+ %	1,75± 0,05	5,8±0,4
CD4 \ CD8	1,095± 0,305	1,4± 0,05
CD4+ CD25+ %	7,35± 1,75	6,7±0,27
CD19+ %	11,85± 1,45	19,4± 0,5



NK+ %	17,10± 0,1*	12,7± 0,6
CD3+ NK+ %	1,9± 0,9	2,3±0,16
CD45+ %	96,05± 0,15	97,9± 0,14
Лейкоциты(абс.)	17,2± 2,9*	7,5± 1,22
Лимфоциты %	13,0± 6,0*	35,6±1,2
Лимфоциты(абс.)	2,72± 1,98*	4,6±0,09
Т-лф. (абс.)	1,76± 1,08*	2,8±0,06
В-лф. (абс.)	0,33± 0,465*	0,9± 0,02
Примечание: * - p<0,05 (достоверность по Манн-U тест)		

Полученные нами данные иммунологического исследования пациентов с ОВИН свидетельствуют о практически нормальном содержании В-лимфоцитов в периферической крови. У одного пациента отмечается низкое содержание В-лимфоцитов, подтверждая тем самым ранний дефект дифференцировки в костном мозге, отсутствие необходимых факторов выживания на периферии или присутствие негативной регуляции. Также отмечается нарушение Т-клеточного ответа (таблица 9).

Таблица 10 — Структура возрастного состава и число случаев инфекционного синдрома у пациентов с ОВИН

Заболевание	Средний возраст	Количество случаев
	М±m	
Хронический синусит	21,29±15,8	27
Хронический отит	23,7±14,99	21
Хронический пансинусит	12,16±2,95	18
Хронический ринит	17,14±2,42	22
Пневмония	16,11±2,43	27
Бронхоэктатическая болезнь	33,4±13,91	10
ХОБЛ	47,33±3,51	3

Согласно, данным представленным в таблице у пациентов с ОВИН, наиболее ведущими нозологиями явились хронический синусит – 27, пневмония – 27, хронический ринит – 22, хронический отит – 21, хронический пансинусит - 18. Средний возраст пациентов с инфекционным синдромом составил от 16 до 47 лет (таблица 10). Таким образом, верификация диагноза ОВИН у исследуемых пациентов была подтверждена комплексным клинико-иммунологическим обследованием. Ведущим был диагностирован инфекционный синдром, в виде частых рецидивирующих респираторных инфекций, частых осложнений со стороны органов дыхания и желудочно-кишечного тракта, а также лабораторно - снижение содержания сывороточных IgG больше 2-х SDs, выраженное снижение уровней IgM и IgA, нарушение продукции специфических антител.

### 3.2 ИССЛЕДОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОБЩЕГО ВАРИАБЕЛЬНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА

По данным ряда исследований, аутоиммунные заболевания наблюдаются приблизительно у 30% пациентов с ОВИН [13,46,50,51,52]. Особенно часто выявлялась аутоиммунная тромбоцитопения (10 до 12%) и аутоиммунная гемолитическая анемия (от 5 до 7%), показывающая значительную корреляцию со спленомегалией, а также ревматоидный артрит [51,52]. Учитывая вышеизложенное, в наше исследование были также включены пациенты с аутоиммунными заболеваниями, для выявления среди данного контингента ОВИН.

Таблица 11 - Характеристика пациентов с аутоиммунными заболеваниями, включенных в исследование для выявления ОВИН

Диагноз	Число больных		Мужской пол		Женский пол	
	N	%	n	%	N	%
Пациенты с аутоиммунными заболеваниями	22	100	5	22,73	17	77,27
ВСЕГО	22	100	5	22,73	17	77,27

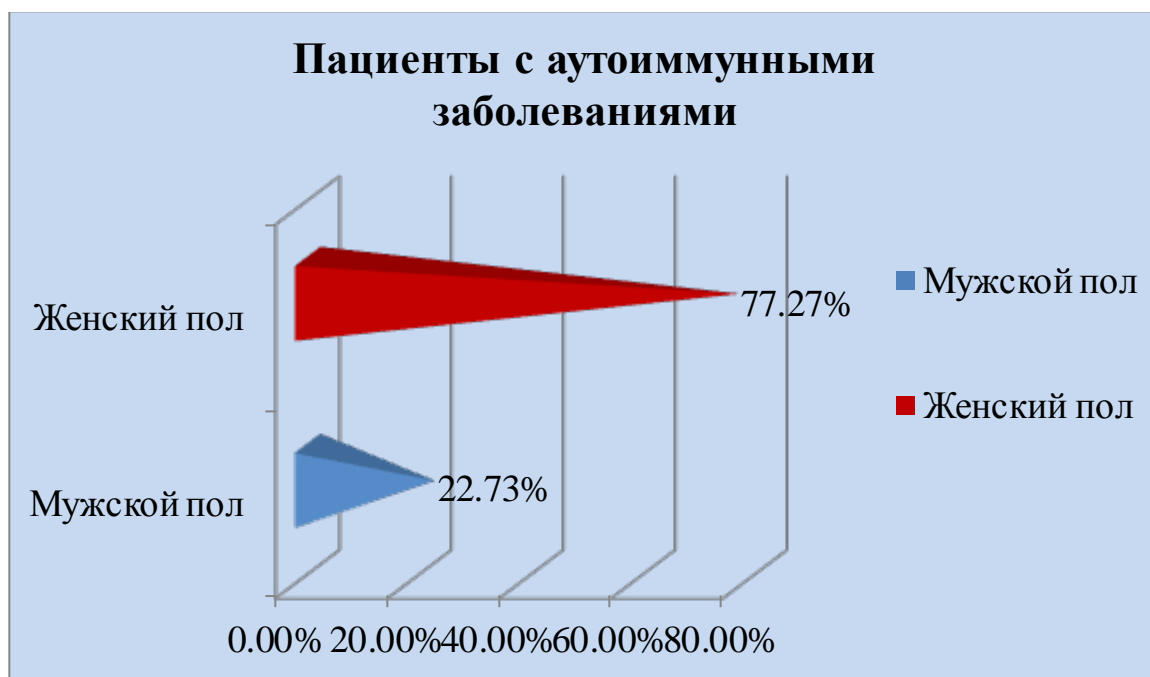


Рисунок 10 - Характеристика пациентов с аутоиммунными заболеваниями, включенных в исследование для выявления ОВИН

При изучении гендерной принадлежности пациентов с аутоиммунными заболеваниями было выявлено, что 22,73% (5) пациентов составили лица мужского пола, 77,27% (17) - женского пола. Таким образом, лиц женского пола в со-

отношении с мужским полом больше на 54,54% (рисунок 10). Средний возраст пациентов данной группы составил – 10,63 лет.

В нашем исследовании были изучены уровни показателей иммуноглобулинов G среди пациентов с аутоиммунными заболеваниями. Как показали результаты исследований, у пациентов с аутоиммунными заболеваниями обнаружены пограничные значений иммуноглобулинов у 3 пациентов. Среднее значения иммуноглобулинов составило IgG – 11,73 г/л.

Таблица 12 - Структура возрастного состава пациентов с аутоиммунными заболеваниями

Группы	Возраст						Абс. чис	%
	2-18 лет		18-30 лет		30-55 лет			
	п	%	п	%	п	%		
Пациенты с аутоиммунными заболеваниями	22	100	0	0	0	0	22	100



Рисунок 11 - Структура возрастного состава пациентов с аутоиммунными заболеваниями

Анализируя структуру возрастного состава пациентов с аутоиммунными заболеваниями, с подозрением на ОВИН получены следующие данные (рисунок 11), все обследованные пациенты были в возрасте от 2 до 18 лет, обследованию подлежали пациенты отделения ревматологии ННЦМД.

Таблица 13 — Показатели иммуноглобулинов класса G крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями

Показатель	Пациенты с аутоиммунными заболеваниями (с низким и пограничным значением IgG)	Пациенты с аутоиммунными заболеваниями (с нормальным значением IgG)
	M±m	M±m
Ig G г\л	4,73±0,49	12,57±3,07
Возраст	6±6,08	11,39±3,20
Абсолютный показатель различия: - p<0,05		

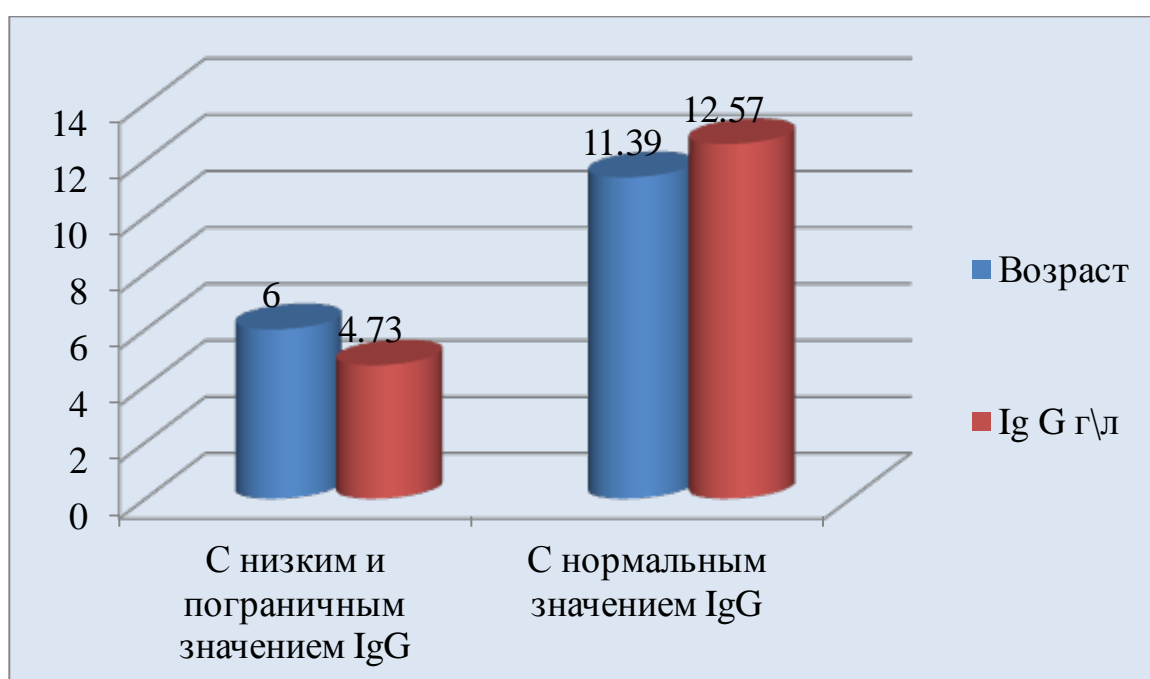


Рисунок 12 - Показатели иммуноглобулинов класса G крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями

При исследовании показателей иммуноглобулинов классов G в крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями, были выявлены низкие значения Ig G  $4,73\pm 0,49$ , что явилось поводом для дальнейшего обследования. В последующем при дополнительном обследовании данным пациентам установлен диагноз ОВИН.

Таблица 14 - Показатели иммунограммы у пациентов с аутоиммунными заболеваниями

Показатель	Пациенты с аутоиммунными заболеваниями (с низким и пограничным значением IgG)	Пациенты с аутоиммунными заболеваниями (с нормальным значением IgG)
	M±m	M±m
CD3+ %	53,35± 2,05*	75,1± 0,7
CD3+ DR+ %	8,5± 0,1	7,0± 0,4
DR от CD3	23,65± 2,15	10,2± 0,5
CD4+ %	28,5± 3,1	37,5± 0,9
CD8+ %	26, 50± 4,55	28,9± 0,6
CD3-CD8+ %	1,8± 0,05	5,9±0,4
CD4 \ CD8	1,1± 0,30	1,6± 0,05
CD4+ CD25+ %	7,40± 1,75	6,6±0,27
CD19+ %	11,86± 1,45	19,7± 0,5
NK+ %	17,20± 0,1*	12,9± 0,6
CD3+ NK+ %	1,9± 0,9	2,4±0,16
CD45+ %	97,05± 0,15	98,9± 0,14
Лейкоциты(абс.)	18,2± 2,9*	6,5± 1,22
Лимфоциты %	14,0± 6,0*	35,4±1,2
Лимфоциты(абс.)	2,75± 1,98*	4,7±0,09
Т-лф. (абс.)	1,77± 1,08*	2,9±0,06
В-лф. (абс.)	0,35± 0,465*	0,9± 0,02
Примечание: * - p<0,05 (достоверность по Манн-U тест)		

Данные иммунограммы пациентов с аутоиммунными заболеваниями свидетельствуют о практически нормальном содержании В-лимфоцитов в периферической крови.

Таким образом, было выявлено, что ОВИН встречался под «маской» аутоиммунных заболеваний в 13,6% случаев (у 3-х пациентов).

### 3.3 ИССЛЕДОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОБЩЕГО ВАРИАБЕЛЬНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА

Как показывает мировая практика, в большинстве случаев пациенты с ОВИН имеют повышенный риск развития онкогематологических заболеваний. Наиболее частыми нозологиями являются острый лимфобластный лейкоз и лимфомы. Доброкачественная лимфопролиферация наблюдается у 40 - 50% пациентов с ОВИН, часто проявляющаяся, как спленомегалией (от 10 до 20%), так и локальной или распространенной лимфаденопатией [37, 38]. В сочетании с лимфопролиферацией, пациенты с ОВИН имеют повышенный риск развития лимфом. Также было обнаружено, что пациенты с установленным диагнозом ОВИН имели повышенную радиочувствительность, который является фактором риска развития онкологических заболеваний [39, 67].

В связи с вышеизложенным, в нашем исследовании были изучены иммунологические показатели среди пациентов с онкогематологическими заболеваниями.

Таблица 15 - Характеристика пациентов с онкогематологическими заболеваниями, включенных в исследование для выявления ОВИН

Диагноз	Число больных		Мужской пол		Женский пол	
	N	%	n	%	N	%
Пациенты с онкогематологическими заболеваниями	41	100	20	48,78	21	51,22
ВСЕГО	41	100	20	48,78	21	51,22

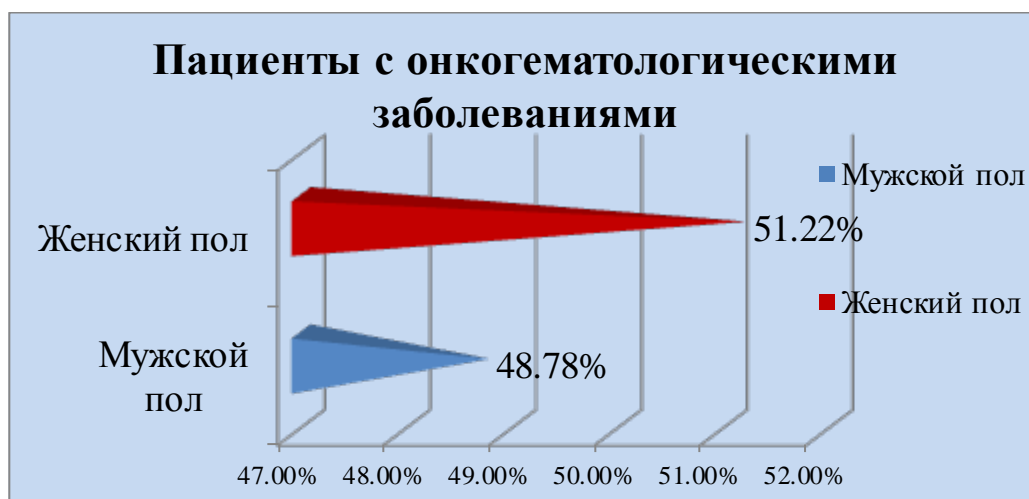


Рисунок 13 - Характеристика пациентов с онкогематологическими заболеваниями, включенных в исследование для выявления ОВИН

При анализе распределения больных с онкогематологическими заболеваниями по половому признаку выявлено, что 48,78% пациентов, включенных в исследование мужского пола, 51,22% - женского пола. Из всех больных, находящихся под наблюдением, лица мужского пола составили 20 человек, женского пола – 21. Таким образом, лиц женского пола в соотношении с мужским полом больше на 2,44% (рисунок 13).

Таблица 16 - Структура возрастного состава пациентов с онкогематологическими заболеваниями

Группы	Возраст						Абс. чис	%
	2-18 лет		18-30 лет		30-55 лет			
	n	%	N	%	n	%		
Пациенты с онкогематологическими заболеваниями	4	9,76	20	48,78	17	41,46	41	100

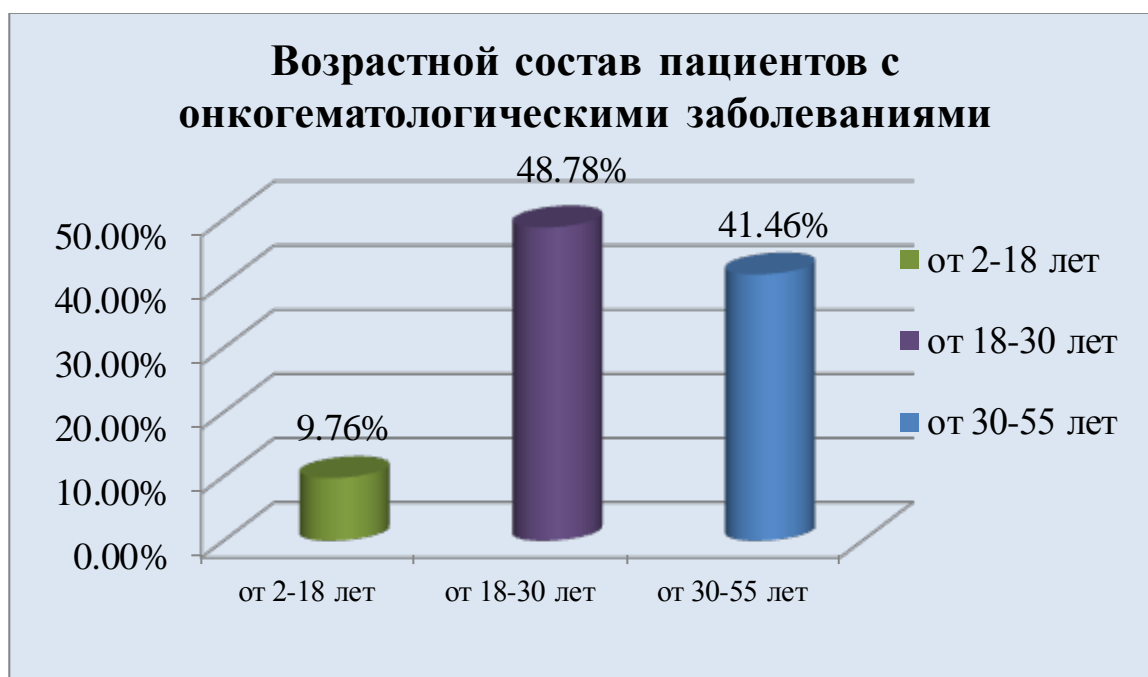


Рисунок 14- Структура возрастного состава пациентов с онкогематологическими заболеваниями

При изучении гендерной принадлежности пациентов с онкогематологическими заболеваниями было выявлено, что 48,78% (20) пациентов составили лица мужского пола, 51,22% (21) - женского пола. Таким образом, лиц женского пола в соотношении с мужским полом больше на 2,44% (рисунок 14). Средний возраст пациентов данной группы составил – 28,73 лет.

В нашем исследовании были изучены уровни показателей иммуноглобулинов G среди пациентов с онкогематологическими заболеваниями. Как показали результаты исследований, у пациентов с онкогематологическими заболеваниями обнаружены пограничные значения иммуноглобулинов у 4 пациентов, показатели ниже нормальных значений у 5 пациентов. Среднее значения иммуноглобулинов составило IgG – 7,54 г/л.

Таблица 17 — Показатели иммуноглобулинов класса G крови пациентов с онкогематологическими заболеваниями

Показатель	Пациенты с онкогематологическими заболеваниями (с низким и пограничным значением IgG)	Пациенты с онкогематологическими заболеваниями (с нормальным значением IgG)
	M±m	M±m
Ig G г\л	4,58±1,63	10,60±2,9
Возраст	35,11±13,59	26,43±9,02
Абсолютный показатель различия: - p<0,05		

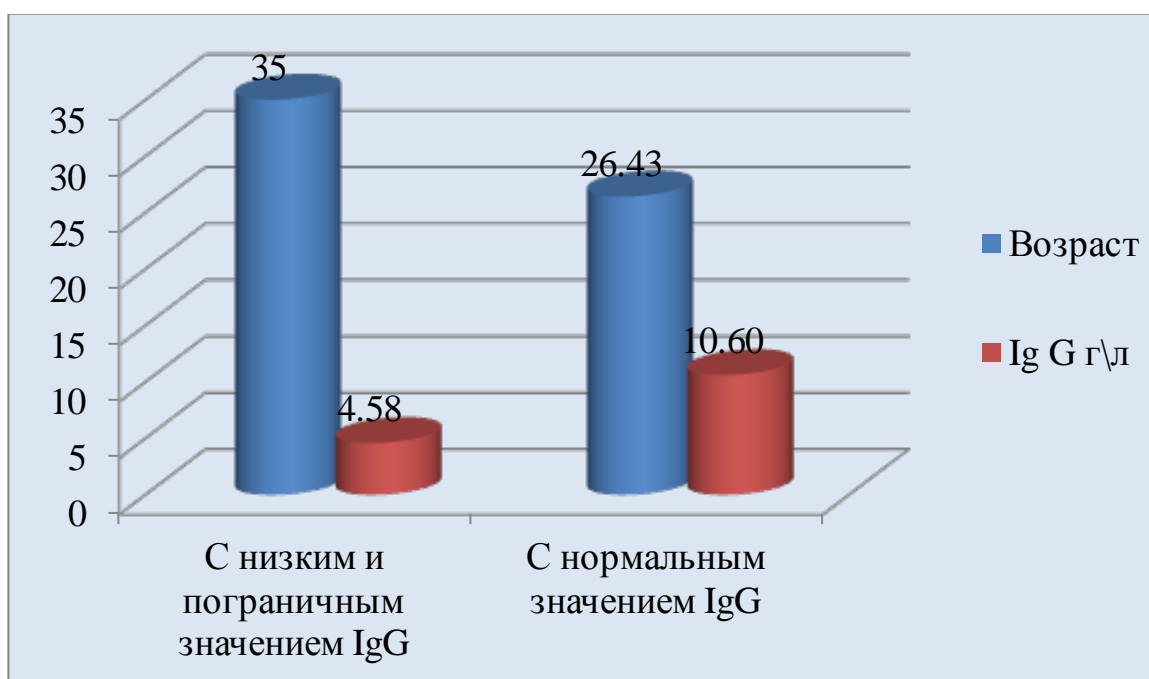


Рисунок 15 — Показатели иммуноглобулинов класса G в крови пациентов с онкогематологическими заболеваниями

При исследовании показателей иммуноглобулинов классов G в крови пациентов с онкогематологическими заболеваниями, были выявлены низкие значения Ig G 4,58±1,63, что явилось поводом для дальнейшего обследования. В последующем при дополнительном обследовании данным пациентам установлен диагноз ОВИН.



Таблица 18 — Показатели иммунограммы у пациентов с онкогематологическими заболеваниями

Показатель	Пациенты с онкогематологическими заболеваниями (с низким и пограничным значением IgG)	Пациенты с онкогематологическими заболеваниями (с нормальным значением IgG)
	M±m	M±m
CD3+ %	55,35± 2,05*	70,1± 0,7
CD3+ DR+ %	9,1± 0,1	7,1± 0,4
DR от CD3	25,85± 2,15	10,1± 0,5
CD4+ %	25,5± 3,1	36,5± 0,9
CD8+ %	26,47± 4,55	27,9± 0,6
CD3-CD8+ %	1,8± 0,05	5,8±0,4
CD4 \ CD8	1,095± 0,305	1,4± 0,05
CD4+ CD25+ %	7,37± 1,75	6,7±0,27
CD19+ %	11,88± 1,45	19,4± 0,5
NK+ %	17,30± 0,1*	12,7± 0,6
CD3+ NK+ %	1,8± 0,9	2,3±0,16
CD45+ %	96,05± 0,15	97,9± 0,14
Лейкоциты(абс.)	3,2± 2,9*	5,2± 1,22
Лимфоциты %	13,0± 6,0*	35,6±1,2
Лимфоциты(абс.)	2,72± 1,98*	4,6±0,09
Т-лф. (абс.)	1,76± 1,08*	2,8±0,06
В-лф. (абс.)	0,35± 0,465*	0,9± 0,02
Примечание: * - p<0,05 (достоверность по Манн-У тест)		

Данные иммунограммы пациентов с ОВИН свидетельствуют о практически нормальном содержании В-лимфоцитов в периферической крови. Также отмечается нарушение Т-клеточного ответа. Таким образом, было выявлено, что ОВИН встречался под «маской» онкогематологических заболеваний в 21,95% случаев (у 9-х пациентов).

Дополнительной возможностью для постановки диагноза ОВИН у онкогематологических пациентов, может являться определение предикторов В-лимфоцитов памяти, которые формируются у человека после завершения иммунного ответа. Большинство пациентов имеет нарушения в изотип-переключенных В-лимфоцитах памяти (IgM-IgD-CD27+) от снижения по сравнению с возрастной нормой до полной редукции [6].

### 3.4 ИССЛЕДОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОБЩЕГО ВАРИАБЕЛЬНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА

По данным исследований известно, что в структуре заболеваемости у пациентов с ОВИН, преобладали инфекции респираторного тракта, часто обусловленные оппортунистическими инфекциями. У 10% пациентов с ОВИН наблюдались диссеминированные формы туберкулеза легких [68]. Учитывая вышеизложенное, в наше исследование были также включены пациенты с диссеминированными формами туберкулеза легких для выявления среди данного контингента ОВИН.

Таблица 19 - Характеристика пациентов с туберкулезом легких, включенных в исследование для выявления ОВИН

Диагноз	Число больных		Мужской пол		Женский пол	
	N	%	n	%	N	%
Пациенты с туберкулезом легких	42	100	23	54,76	19	45,24
ВСЕГО	42	100	23	54,76	19	45,24

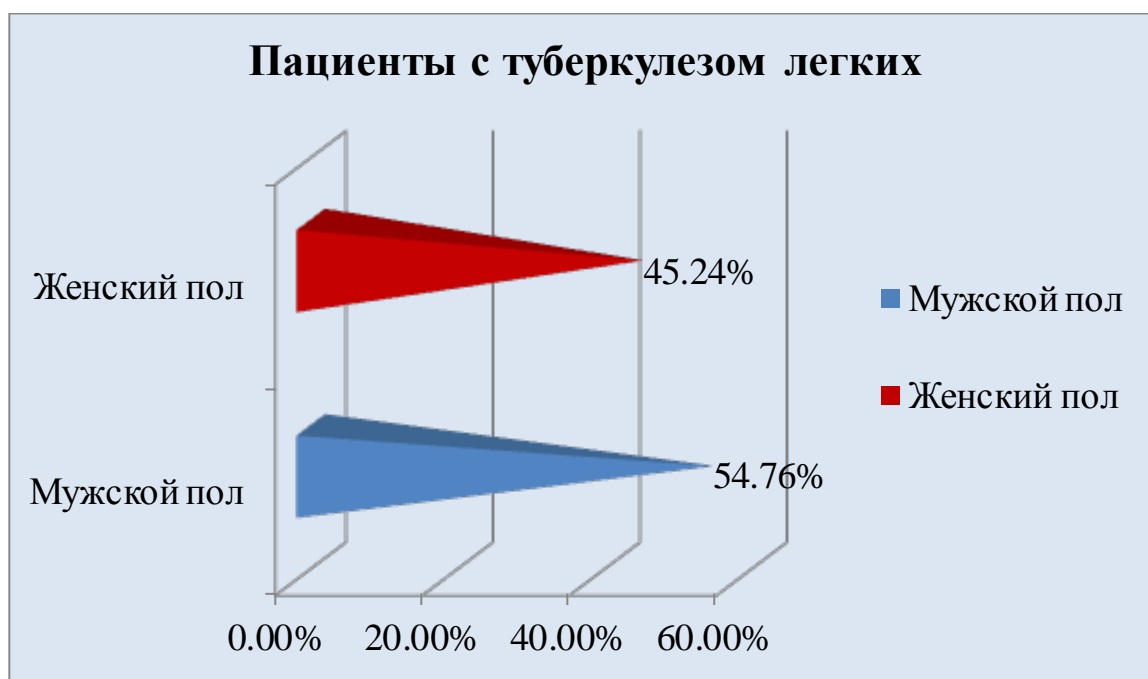


Рисунок 16 - Характеристика пациентов с туберкулезом легких, включенных в исследование для выявления ОВИН

При изучении гендерной принадлежности пациентов с туберкулезом легких было выявлено, что 54,76% (23) пациентов составили лица мужского пола, 45,24% (19) - женского пола. Таким образом, лиц мужского пола в соотноше-

нии с женским полом больше на 9,52% (рисунок 16). Средний возраст пациентов данной группы составил – 12,5 лет.

В нашем исследовании были изучены уровни показателей иммуноглобулинов G среди пациентов с туберкулезом легких. Как показали результаты исследований, у пациентов с туберкулезом легких обнаружены пограничные значения иммуноглобулинов у 5 пациентов. Среднее значения иммуноглобулинов составили IgG – 10,57 г/л.

Таблица 20 - Структура возрастного состава пациентов с туберкулезом легких

Группы	Возраст						Абс. чис	%
	2-18 лет		18-30 лет		30-55 лет			
	п	%	п	%	п	%		
Пациенты с туберкулезом легких	35	83,33	7	16,67	0	0	42	100

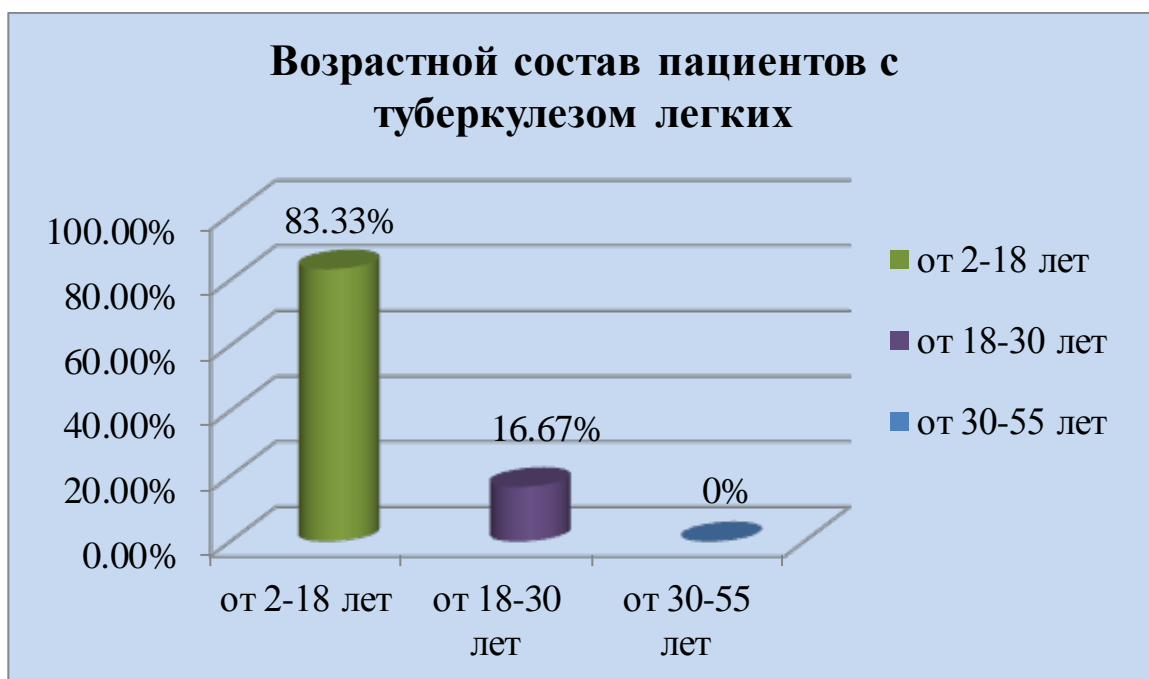


Рисунок 17 - Структура возрастного состава пациентов с туберкулезом легких

Анализируя структуру возрастного состава пациентов с туберкулезом легких, с подозрением на ОВИН получены следующие данные (рисунок 17), обследованные пациенты в возрасте от 2 до 18 лет составили 83,33% (35 человек), от 18 до 30 лет – 16,67% (7 человек), обследованию подлежали пациенты детского отделения ГККП «Противотуберкулезный диспансер».

Таблица 21 — Показатели иммуноглобулинов класса G крови пациентов с туберкулезом легких

Показатель	Пациенты с туберкулезом легких (с низким и пограничным значением IgG)	Пациенты с туберкулезом легких (с нормальным значением IgG)
	M±m	M±m
Ig G г\л	5,95±0,58	11,05±3,03
Возраст	15,2±3,11	12,14±6,21
Абсолютный показатель различия: - p<0,05		

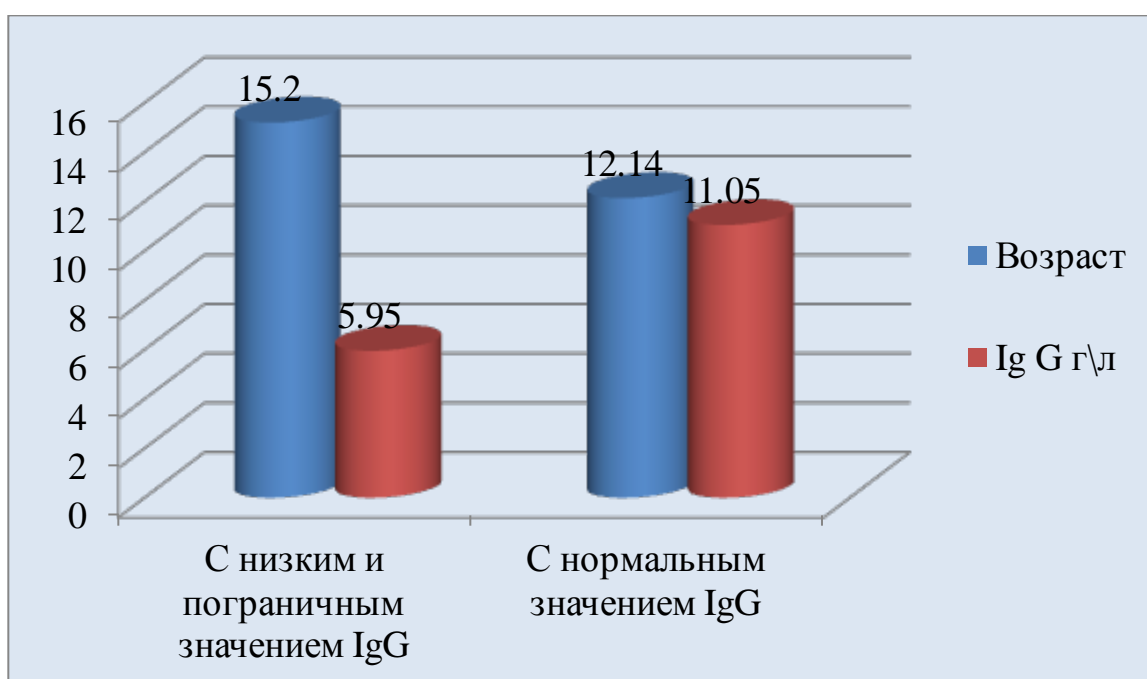


Рисунок 18 — Показатели иммуноглобулинов класса G крови пациентов с туберкулезом легких

При исследовании показателей иммуноглобулинов классов G в крови пациентов с туберкулезом легких, были выявлены низкие значения Ig G 5,95±0,58, что явилось поводом для дальнейшего обследования. В последующем при дополнительном обследовании данным пациентам установлен диагноз ОВИН.

Таблица 22 — Показатели иммунограммы у пациентов с туберкулезом легких

Показатель	Пациенты с туберкулезом легких (с низким и пограничным значением IgG)	Пациенты с туберкулезом легких (с нормальным значением IgG)
	M±m	M±m
CD3+ %	59,35± 2,05*	75,1± 0,7
CD3+ DR+ %	8,1± 0,1	7,0± 0,4
DR от CD3	23,85± 2,15	10,1± 0,5
CD4+ %	27,5± 3,1	36,8± 0,9
CD8+ %	26,450± 4,55	27,9± 0,6
CD3-CD8+ %	1,75± 0,05	5,8±0,4
CD4 \ CD8	1,09± 0,305	1,4± 0,05
CD4+ CD25+ %	7,35± 1,75	6,7±0,27
CD19+ %	15,85± 1,45	19,4± 0,5
NK+ %	17,10± 0,1*	12,7± 0,6
CD3+ NK+ %	1,9± 0,9	2,3±0,16
CD45+ %	96,05± 0,15	97,9± 0,14
Лейкоциты(абс.)	12,2± 2,9*	7,5± 1,22
Лимфоциты %	13,0± 6,0*	35,6±1,2
Лимфоциты(абс.)	2,72± 1,98*	4,6±0,09
Т-лф. (абс.)	1,76± 1,08*	2,8±0,06
В-лф. (абс.)	0,33± 0,465*	0,8± 0,02
Примечание: * - p<0,05 (достоверность по Манн-U тест)		

Данные иммунограммы пациентов с ОВИН свидетельствуют о практически нормальном содержании В-лимфоцитов в периферической крови.

Таким образом, было выявлено, что ОВИН встречался под «маской» диссеминированных форм туберкулёза легких в 11,90% случаев (у 5-х пациентов).

### 3.5 ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛ ДНК TREC И KREC У ПАЦИЕНТОВ С ОБЩЕЙ ВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

В настоящее время приоритетными в иммунологической практике являются высокоточные и экономически доступные методы исследования. Одним из таких является новый молекулярный метод диагностики – определение колец эксцизии, образующихся при реанжировке генов Т-клеточного (ТРЕК) и В-клеточного (КРЕК) иммунологии. Основным показанием для назначения для данного вида исследования при ОВИН – классификация больных.

Созревание функциональных Т- и В-клеток человека сопровождается рекомбинацией и перестройками в генах, кодирующих Т- (TCR) и В- (BCR) клеточные рецепторы [137]. Так, для сборки полноценного Т-клеточного рецептора должна произойти перестройка локуса TCRB, в ходе которой происходит соединение D и J сегмента и последующее присоединение V сегмента, и также слияние V и J сегментов локуса TCRA. При этом образуется третий гипервариабельный домен (CDR3) бета- и альфа-цепи соответственно. Во время каждого из этих процессов вырезаемые участки образуют эксцизионные кольца ДНК, получившие название TREC (TCR rearrangement excision circles). Генерируемая при этом кольцевая молекула была названа TREC (signal joint TCR rearrangement excision circle), она присутствует практически у всех  $\alpha\beta^+$  Т-лимфоцитов, выходящих из тимуса, и, таким образом, может служить суррогатным маркером их количества [138]. Процесс формирования функционального рецептора в В-клетках начинается с рекомбинационных событий в IGH локусе, несущем набор различных Vh, D и Jh сегментов, в котором также генерируется большое количество эксцизионных колец ДНК. Если перестройка прошла правильно, начинается рекомбинация в IGK локусе, кодирующем последовательности легкой каппа-цепи иммуноглобулинов. Данная перестройка ведет к образованию рекомбинационного кольца каппа-делеционного элемента, или KREC (каппа-deleting recombination excision circle), которое присутствует в 30% зрелых наивных В-лимфоцитах. ДНК KREC также может быть суррогатным маркером зрелых наивных В-лимфоцитов, а также использоваться для оценки их пролиферативной истории [139].

Таблица 23 — Показатели KREC и TREC у пациентов с ОВИН

№ пациента	KREC	TREC
1	3.48E+01	2.33E-01
2	1.01E+02	5.00E+04
3	2.51E+01	2.55E-01
4	1.55E+02	4.50E+04
5	7.78E+03	5.00E+03
6	3.51E+02	7.00E+03
7	1.56E+02	7.40E+03
8	1.53E+02	6.00E+03

9	7.77E+01	2.00E+02
10	5.00E+03	4.60E+03
11	4.55E+01	2.02E+01
12	6.56E+01	3.03E+01
13	1.26E+02	4.50E+04
14	5.00E+03	2.00E+04
15	1.81E+02	4.00E+04
16	2.78E+02	1.00E+02
17	5.60E+02	5.50E+04
18	6.00E+03	7.50E+04
19	4.00E+02	4.50E+04
20	4.56E+02	4.70E+04

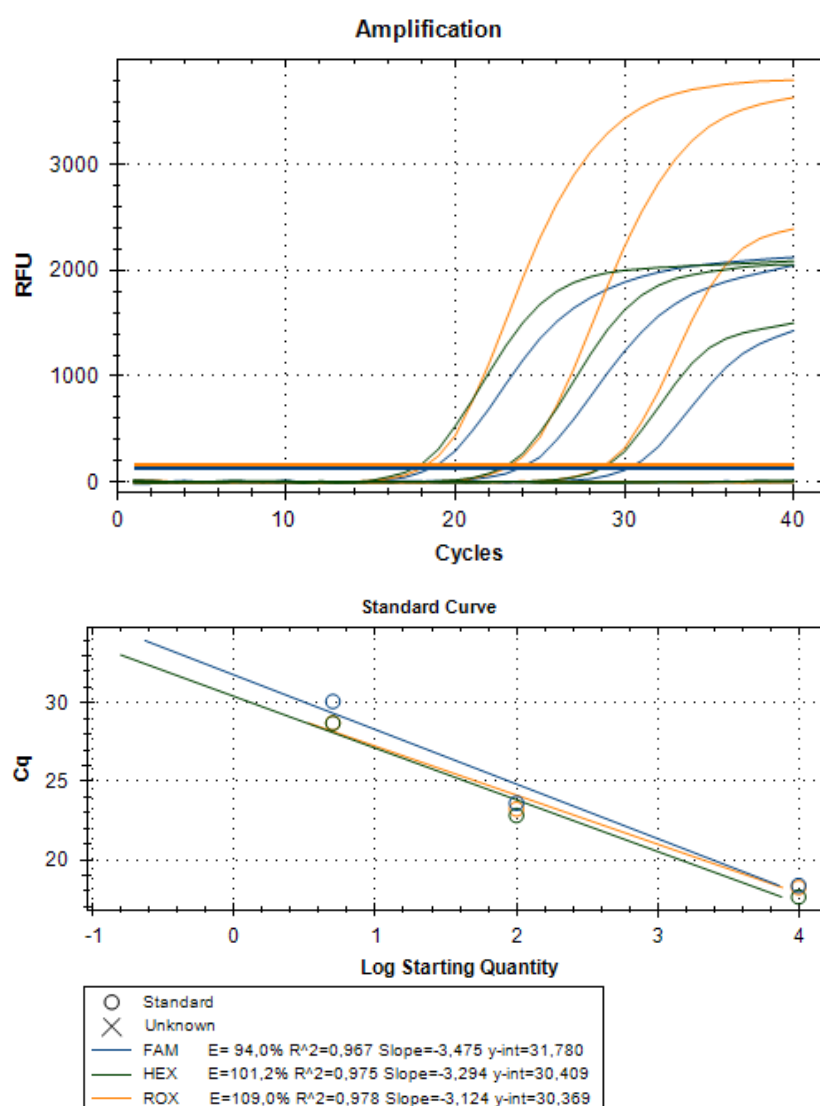


Рисунок 19 – Программа амплификации

Согласно полученным данным, указанных в таблице 24 и графиках, определение молекул ДНК TREC и KREC в крови пациентов с ОВИН, имеет высокую диагностическую значимость. Как показывает клиническая практика,

в случаях, когда показатели иммунограммы имеют нормальные значения, то исследование уровней TREC и KREC позволяют в 100% случаев выставить диагноз ОВИН.

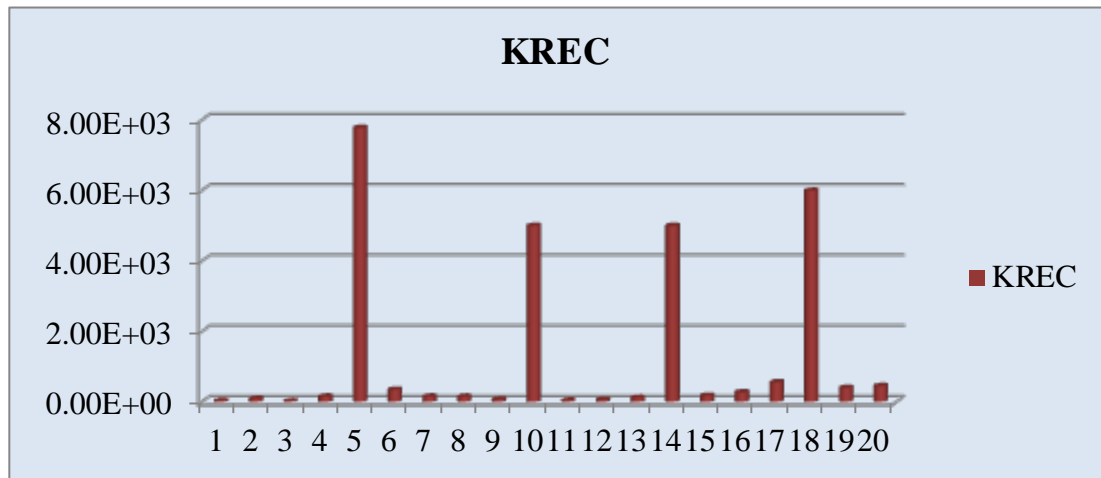


Рисунок 20 — Показатели KREC у пациентов с ОВИН

Представленные показатели KREC, свидетельствуют о подтверждения диагноза ОВИН. У 80% обследованных пациентов наблюдается снижение уровней KREC (рисунок 20). Указанные в графике показатели были выражены в экспоненциальной системе, при проведении сравнительного анализа и переводе в числовой формат, было обнаружено снижение показателей KREC в 223 раза.

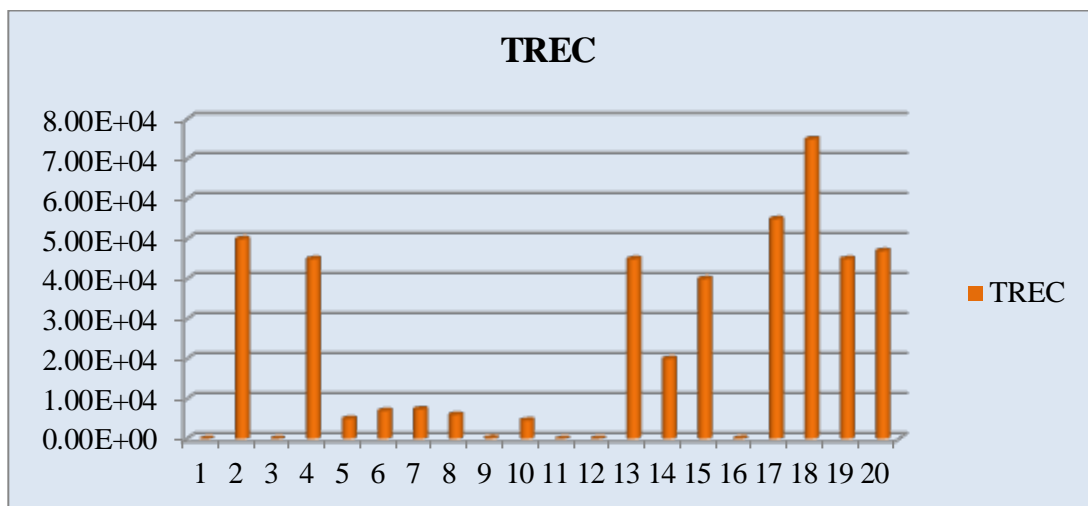


Рисунок 21 — Показатели TREC у пациентов с ОВИН

Представленные показатели TREC, свидетельствуют о подтверждения диагноза ОВИН. У 30% обследованных пациентов наблюдается снижение уровней TREC (рисунок 21). Указанные в графике показатели были выражены в экспоненциальной системе, при проведении сравнительного анализа и переводе в числовой формат, было обнаружено снижение показателей TREC в 375 раз.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей диссертационной работе впервые изучены клинико-иммунологические показатели общей ОВИН у пациентов РК.

В соответствии с целями и задачами магистерской работы был разработан алгоритм диагностики ОВИН, разработана и утверждена методология ОВИН, включающая определение значимых иммунологических параметров заболевания. Определение Т-клеток памяти, наивных Т-лимфоцитов, наивных В-клеток, В-клеток памяти и функционально незрелых В-лимфоцитов методом проточной цитометрии, было оформлено, как акт внедрения инновационной технологии на базе лаборатории АО «РДЦ». Внедрение данных методов исследования позволило подтверждать диагноз ОВИН и классифицировать заболевание по классификации Euroclass ( чья стран. год).

Использование современных подходов в диагностике ОВИН позволит своевременно определять правильную тактику ведения пациента, прогнозировать течение заболевания, что в итоге будет способствовать увеличению продолжительности жизни пациентов, снижению инвалидизации и летальности от ПИД.

В ходе проведенного нами исследования пациентов в 6 областях Республики Казахстан (Акмолинской, Алматинской, Карагандинской, Западно-Казахстанской, Мангыстауской и Атырауской), было выявлено 30 пациентов с диагнозом ОВИН. При первичном отборе пациентов использовалась специально разработанная анкета, позволяющая врачам выявлять заболевание при скрининговом осмотре.

Клиническое обследование пациентов выявило наличие тяжелых инфекционных поражений дыхательных путей (пневмония, бронхоэктатическая болезнь), гнойных пансинуситов, соматических заболеваний в виде аутоиммунного заболевания - болезнь Крона, и развитием тяжелой тугоухости. Двое взрослых пациентов имеют 2 и 3 группу инвалидности по основному заболеванию.

Пациенты прошли расширенное иммунологическое обследование согласно разработанному алгоритму, включающему определение иммуноглобулинов, основных показателей иммунного статуса и углубленного изучения Т и В-клеток методом проточной цитометрии.

ОВИН характеризуются нарушением функционирования В-лимфоцитов, что приводит к снижению IgG, IgA и/или IgM, IgE в сыворотке крови. Для пациентов с подозрением на ОВИН уровень сывороточного IgG должен быть меньше нижней границы нормы, определенной для соответствующей возрастной группы. Результат исследования уровня иммуноглобулинов зависит от использованного метода определения, этнической принадлежности, соотношения полов и возрастных особенности референсной популяции. Несмотря на широкую вариабельность уровня IgG у пациентов с ОВИН большинство пациентов имеют исходный уровень IgG меньше 4-5 г/л.

По данным литературы около 90% всех пациентов с ОВИН имеют практически нормальное количество В-лимфоцитов в периферической крови. 5-10% пациентов имеют низкое число В лимфоцитов (<1% от лимфоцитов), подтверждая тем самым ранний дефект дифференцировки в костном мозге, отсутствие необходимых факторов выживания на периферии или присутствие негативной регуляции.

В настоящее время в Республике Казахстан, на основе рекомендаций Европейской ассоциации иммунодефицитов (European Society for Immunodeficiencies), разработан регистр пациентов с ПИД. Ведение данного регистра, который в перспективе будет введен в сайт первичных иммунодефицитов в Республике Казахстан ([www.pid.kz](http://www.pid.kz)), позволит улучшить раннюю диагностику заболевания, проводить контроль ведения пациентов.

## ВЫВОДЫ

1. Результаты исследования показали, что в структуре первичных иммунодефицитов, зарегистрированных в национальном реестре РК, пациенты с ОВИН занимают лидирующие позиции и составили 27,66% от общего числа ПИД.
2. Согласно полученным данным, возраст дебюта данного заболевания колебался от 2-40 лет (19,53 лет), пик заболеваемости приходился на период от 20 до 30 лет, что позволило выделить два пика манифестации данного заболевания: 1 - от 5 до 10 лет, 2 - от 20 до 30 лет. Продолжительность периода до установления диагноза ОВИН у пациентов составила от 1 года до 16 лет, что в ряде случаев свидетельствовало о поздней диагностике данного патологического состояния.
3. Клиническими особенностями течения ОВИН является преобладание рецидивирующих респираторных инфекций: пневмонии (90%), синуситы (90%), пансинуситы (60%), отиты (70%), риниты (73,33%), характеризующиеся затяжным, осложненным течением (100%) и наличием тяжелой сопутствующей патологии - бронхоэктатическая болезнь легких (33,33%), ХОБЛ (10%), онкогематологические заболевания (до 30%), поражения ЖКТ (до 10%), аутоиммунный синдром (до 6,67%).
4. Диагностическими значимыми критериями диагностики ОВИН являются исследование гуморального звена иммунитета (Ig G), KREC, TREC. Результаты собственных исследований выявили, снижение уровня IgG на 2 стандартных отклонения от возрастной нормы, а также снижение уровней KREC в 223 раза у 80% и снижение уровней TREC в 375 раз у 30%, что свидетельствовало о наличии ОВИН.
5. Результаты проведенного исследования позволили выделить наиболее значимые клиничко-иммунологические маркеры ОВИН и разработать алгоритм диагностики на разных этапах оказания медицинской помощи.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для своевременной постановки диагноза ОВИН необходимо использовать в работе врача алгоритм диагностики ОВИН на разных этапах оказания медицинской помощи.
2. Учитывая высокий риск развития аутоиммунных, онкогематологических заболеваний среди пациентов с ОВИН, целесообразным является обследование пациентов с данными нозологиями на диагностические иммунодефициты с целью раннего выявления диагноза и своевременного назначения заместительной терапии.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ochs H.D., Smith E., Puck J. Primary Immunodeficiency Diseases - 2007. – OXFORD. – p.726.
2. Francisko A. Bonila, I. Leonard Berstein et. al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiencies. – 2005. – Boston. – p. 61.
3. Salzer U., Warnatz K., Peter H.H. Common variable immunodeficiency - an update. // *Arthritis Res Ther.* – 2012. - vol.14(5). – P. 223-230.
4. Ковзель Е.Ф., Розенсон Р.И., Моренко М.А. Первичные иммунодефициты в Республике Казахстан. // *Вестник АГИУВ, Алматы* – 2013. – С. 103-105.
5. László Maródi & Luigi D. Notarangelo. Immunological and genetic bases of new primary immunodeficiencies / *Nature Reviews Immunology.* - vol. 7. – P.851-861.
6. Шарапова С.О., Гурьянова И.Е., Романцова А.С., Мигас А.А., Шепелевич Е.В., Белевцев М.В. Результаты генетического консультирования и пренатальной диагностики в семьях с X-сцепленными первичными иммунодефицитами у детей // *Достижения медицинской науки Белоруссии.* - 2012. - №17 – С.51-55.
7. Modell V. The impact of physician education and public awareness on early diagnosis of primary immunodeficiencies. // *Immunol Res.* – 2007. - vol.38. – P. 43–47.
8. Modell F. Immunology today and new discoveries: building upon legacies of Dr. Robert A. Good. // *Immunol Res.* – 2007. - vol.38. – P. 48–50.
9. Modell V, Gee B, Lewis DB, Orange JS, Roifman CM, Routes JM, Sorensen RU, Notarangelo LD, Modell F. Global study of primary immunodeficiency diseases (PI)—diagnosis, treatment, and economic impact: an updated report from the Jeffrey Modell Foundation. // *Immunol Res.* – 2011. - vol.51. – P. 61–70.
10. Modell F., Puente D., Modell V. From genotype to phenotype. Further studies measuring the impact of a Physician Education and Public Awareness Campaign on early diagnosis and management of Primary Immunodeficiencies. // *Immunol Res.* – 2009. - vol.44(1–3). – P. 132–149.
11. Milner J.D., Holland S.M. The cup runneth over: lessons from the ever-expanding pool of primary immunodeficiency diseases. // *Immunology.* – 2013. - vol.13. – P. 635–648.
12. Lucas M., Lee M., Lortan J., Lopez-Granados E., Misbah S., Chapel H. Infection outcomes in patients with common variable immunodeficiency disorders: relationship to immunoglobulin therapy over 22 years. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2010. - vol.125. – P. 1354–1360.
13. Ballou M. Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2012. - vol.109(4). – P. 581–591.
14. Casanova J.L., Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. // *Science.* – 2007. - vol.317. – P. 617–619.
15. Inborn Errors Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation; European Society for Immunodeficiency. Transplantation of hematopoietic stem cells and longterm survival for primary immunodeficiencies in

Europe: entering a new century, do we do better? // *J Allergy Clin Immunol.* – 2010. - vol.126. – P. 602–610.

16. Boztug K., Schmidt M., Schwarzer A., Banerjee P.P., Di´ez I.A., Dewey R.A., Bo¨hm M., Nowrouzi A., Ball C.R., Glimm H., Naundorf S., Ku¨hlcke K., Blasczyk R., Kondratenko I., Maro´di L., Orange J.S., von Kalle C., Klein C. Stem-cell gene therapy for the Wiskott–Aldrich syndrome. // *N Engl J Med.* – 2010. - vol.363(20). – P. 1918–1927.

17. Grunebaum E., Notarangelo L.D., Roifman C.M. Successful correction of severe combined immune deficiency following transplantation with bone marrow from HLA-matched unrelated donors. // *Ital J Pediatr.* – 2007. - vol.33. – P. 24–26.

18. Bharat S.T., Alizadehfar R., Desrosiers M., Shuster J., Pant N., Tsoukasa C.M. Adult primary immune deficiency: what are we missing? // *Am J Med.* – 2012. - vol.125(8). – P. 779–786.

19. Al-Herz W., Notarangelo D.L. Classification of primary immunodeficiency disorders: One-fits-all does not help anymore. // *Clinical Immunology.* – 2012. - vol. 144. - P. 24-25.

20. Slabkaja E.V., Aksenova S.A., Barsukova V.V., Meshkova R.Ja. Sozdanie registra pervichnyh immunodeficitov Smolenskoj oblasti (Creating a registry of primary immunodeficiencies Smolensk region), *Allergologija i immunologija v pediatrii*, 2012, No.4, pp. 25-28 (in Russian).

21. Pishalnokov A.Y., Moiseeva T.N. Analiz dinamiki osnovnih fenotipicheskikh proyavlenii immunnoi nedostatochnosti u pacientov s pervichnimi immunodeficitami po rezultatam mnogoletnego nablyudeniya, *Vestnik YuUrGU*, 2009, No.20, pp. 100-105 (in Russian).

22. Tuzakina I.A., Karakina M.L., Vlasova E.V. Analiz klinicheskikh proyavlenii debjuta pervichnyh immunodeficitov u vzroslyh (Analysis of clinical manifestations of primary immunodeficiencies debut in adults), *Medicinskaja immunologija*, 2014, Vol. 16, No. 4, pp. 367-374 (in Russian).

23. Sibgatullina F.I., Fathullina R.S. Pervichnie immunodeficiti u detei v Respublike Tatarstan, 2009 (in Russian).

24. Luncov A.V., Skorohodkina O.V., Nurhametova D.F. Infekcionnyi sindrom u bolnyh s pervichnymi immunodeficitami i vozmozhnosti ego korekcii (Infectious syndrome in patients with primary immunodeficiencies and possibilities of its correction), *Prakticheskaja medicina*, 2015, Vol. 2, No. 4, pp. 72-75 (in Russian).

25. Otalbaev N.K., Kovzel E.F. Pervichnye immunodeficiency (Primary immunodeficiencies), *Metodicheskie rekomendacii*, 2014, pp. 5-15 (in Russia).

26. Kovzel E.F., Rozenson R.I., Morenko M.A. Pervichnie immunodeficiti v Respublike Kazahstan, *Vestnik AGIUV*, 2013, pp. 103-105 (in Russian).

27. De Vryz E. Mnogostupenchatyi diagnosticheskii protokol skriniga pacientov na nalichie pervichnogo immunodeficita, razrabotannyj dlja vrachej-neimmunologov (Multistage diagnostic protocol screening patients for the presence of primary immunodeficiency, designed for doctors not an immunologist), *Medicinskaja immunologija*, 2013, Vol. 15, No. 5, pp. 477-492 (in Russia).

28. Kirkpatrick P, Riminton S. Primary immunodeficiency diseases in Australia and New Zealand. //J Clin Immunol. – 2007- №27- P.517–524.
29. Rhim J.W., Kim K.H., Kim D.S., et al. Prevalence of primary immunodeficiency in Korea. //J Korean Med Sci. – 2012. - №27. – P.788–793.
30. Ishimura M., Takada H., Doi T. et al. Nationwide survey of patients with primary immunodeficiency diseases in Japan. //J Clin Immunol. – 2011. №31 –p.968–976.
31. Cunningham-Rundles C., Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. //Clin Immunol. -2011. №92 – P.34–48.
32. Vorechovsky I., Zetterquist H., Paganelli R. et al. Family and linkage study of selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. //Clin. Immunol. Immunopathol. – 2005. - №77.- P.185–192.
33. Burrows P.D., Cooper M.D. IgA deficiency. //Adv. Immunol. – 2007. - №65 – P.245–276.
34. Park J.H., Resnick E.S., Cunningham-Rundles C. Perspectives on common variable immune deficiency. //Ann NY Acad Sci. – 2011. - №1246 – P.41–49.
35. van Zelm M.C., Reisli I., van der Burg M. et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. //N. Engl J Med. – 2006. -№354 –P.1901–1912.
36. Grimbacher B., Hutloff A., Schlesier M. et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. //Nat Immunol. – 2003. - №4 – P.261–268.
37. Kuijpers T.W., Bende R.J., Baars P.A. et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. //J Clin Invest. -2010. - №120 – P.214–222.
38. van Zelm M.C., Smet J., Adams B. et al. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. //J Clin Invest. – 2010. - №120 – P.1265–1274.
39. Al-Herz W., Bousfiha A., Casanova J.L. et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. Front. Immunol. – 2011. – №2 – P.54
40. Pan-Hammarstrom Q., Salzer U., Du L. et al. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. //Nat Genet. – 2007.- №39 – P.429–430.
41. Sekine H., Ferreira R.C., Pan-Hammarstrom Q. et al. Role for Msh5 in the regulation of Ig class switch recombination. //Proc. Natl. Acad Sci USA. -2007 -№104 – P.7193–7198.
42. Koopmans W., Woon S.T., Brooks A.E., Dunbar P.R., Browett P., Ameratunga R. Clinical variability of family members with the C104R mutation in transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI). //J Clin Immunol. – 2013. - №33 – P.68–73.

43. Chapel H., Lucas M., Lee M. et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. //Blood. – 2008. - №112 – P.277–286.
44. Conley M.E., Dobbs A.K., Farmer D.M. et al. Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. //Annu. Rev. Immunol. – 2009. - №27 – p.199–227.
45. Cunningham-Rundles C. Common variable immunodeficiency. //Curr. Allergy Asthma Rep. – 2001. - №1 – P.421–429.
46. Notarangelo L.D., Fischer A., Geha R.S. et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update. //J. Allergy Clin. Immunol. – 2009. - №124 – P.1161–1178.
47. Chapel H., Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. //Br. J. Haematol. – 2009. - №145 – P.709–727.
48. Hutloff A., Dittrich A.M., Beier K.C. et al. ICOS is an inducible T-cell costimulator structurally and functionally related to CD28. //Nature. – 2009. №397 – P. 263–266.
49. Grimbacher B., Hutloff A., Schlesier M. et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. //Nat. Immunol. – 2003. - №4 – P.261–268.
50. Carter R.H., Fearon D.T. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. //Science. – 2012. - №256 – P.105–107.
51. van Zelm M.C., Reisli I., van der Burg M. et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. //N. Engl. J. Med. – 2006. -№354 – P.1901–1912.
52. Stashenko P., Nadler L.M., Hardy R., Schlossman S.F. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. //J. Immunol. – 2013. - №125 – P.1678–1685.
53. Kuijpers T.W., Bende R.J., Baars P.A. et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. //J. Clin. Invest. – 2010. - №120 – P.214–222.
54. Mackay F., Schneider P., Rennert P., Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. //Annu. Rev. Immunol. – 2003. - №21 – P.231–264.
55. Ng L.G., Sutherland A.P., Newton R. et al. B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. //J. Immunol. – 2004. - №173 – P.807–817.
56. Batten M., Groom J., Cachero T.G. et al. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. //J. Exp. Med. – 2000. - №192 – P.1453–1466.
57. Gross J.A., Dillon S.R., Mudri S. et al. TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. Impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. //Immunity. – 2001. - №15 – P. 289–302.
58. Sasaki Y., Casola S., Kutok J.L. et al. TNF family member B cell-activating factor (BAFF) receptor-dependent and -independent roles for BAFF in B cell physiology. //J. Immunol. – 2004. - №173 – P.2245–2252.
59. Schiemann B., Gommerman J.L., Vora K. et al. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. //Science. – 2001. - №293 – P.2111–2114.



60. Shulga-Morskaya S., Dobles M., Walsh M.E. et al. B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. // *J. Immunol.* – 2004. – №173 – P.2331–2341.
61. Yan M., Brady J.R., Chan B. et al. Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. // *Curr. Biol.* – 2001. - №11 – P.1547–1552.
62. Warnatz K., Salzer U., Rizzi M. et al. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. - №106 – P.13945–13950.
63. Wheat W.H., Cool C.D., Morimoto Y., Rai P.R., Kirkpatrick C.H., Lindenbaum B.A., Bates C.A., Ellison M.C., Serls A.E., Brown K.K., Routes J.M. Possible role of human herpesvirus 8 in the lymphoproliferative disorders in common variable immunodeficiency // *J Exp Med.* – 2005. – Vol.202. – P.479–484.
64. Resnick E.S., Moshier E.L., Godbold J.H., Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades // *Blood.* – 2012. - Vol.119. - P. 1650.
65. Bates C.A., Ellison M.C., Lynch D.A., Cool C.D., Brown K.K., Routes J.M. Granulomatous-lymphocytic lung disease shortens survival in common variable immunodeficiency // *J Allergy Clin Immunol.* – 2004. – Vol.114. – P.415–421.
66. Daniels J.A., Lederman H.M., Maitra A., Montgomery E.A. Gastrointestinal tract pathology in patients with common variable immunodeficiency (CVID): a clinicopathologic study and review // *Am J Surg Pathol.* – 2007. – Vol.31. – P.1800–1812.
67. Ward C., Lucas M., Piris J., Collier J., Chapel H. Abnormal liver function in common variable immunodeficiency disorders due to nodular regenerative hyperplasia // *Clin Exp Immunol.* – 2008. – Vol.153. – P.331–337.
68. Wehr C., Kivioja T., Schmitt C., Ferry B., Witte T., Eren E., Vlkova M., Hernandez M., Detkova D., Bos P.R., Poerksen G., von Bernuth H., Baumann U., Goldacker S., Gutenberger S., Schlesier M., Bergeron-van der Cruyssen F., Le Garff M., Debré P., Jacobs R., Jones J., Bateman E., Litzman J., van Hagen P.M., Plebani A., Schmidt R.E., Thon V., Quinti I., Espanol T., Webster A.D. et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency // *Blood.* – 2008. - Vol.111. – P.77–85.
69. Boileau J., Mouillot G., Gerard L., Carmagnat M., Rabian C., Oksenhendler E., Pasquali J.L., Korganow A.S. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: correlation with lymphocyte phenotype in the French DEFI study // *J Autoimmun.* – 2011. – Vol.36. – P.25–32.
70. Quinti I., Soresina A., Spadaro G., Martino S., Donnanno S., Agostini C., Claudio P., Franco D., Maria Pesce A., Borghese F., Guerra A., Rondelli R., Plebani A. Italian Primary Immunodeficiency Network. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency // *J Clin Immunol.* – 2007. – Vol.27. – P.308–316.

71. Sève P., Bourdillon L., Sarrot-Reynauld F., Ruivard M., Jaussaud R., Bouhour D., Bonotte B., Gardembas M., Poindron V., Thiercelin M.F., Broussolle C., Oksenhendler E. DEF-I Study Group. Autoimmune hemolytic anemia and common variable immunodeficiency: a case-control study of 18 patients // *Medicine (Baltimore)*. - 2008. - Vol.87. - P.177-184.
72. Ochtrop M.L., Goldacker S., May A.M., Rizzi M., Draeger R., Hauschke D., Stehfest C., Warnatz K., Goebel H., Technau-Ihling K., Werner M., Salzer U., Eibel H., Schlesier M., Peter H.H. T and B lymphocyte abnormalities in bone marrow biopsies of common variable immunodeficiency // *Blood*. - 2011. - Vol.118. - P.309-318.
73. Mellemkjaer L., Hammarstrom L., Andersen V., Yuen J., Heilmann C., Barington T., Bjorkander J., Olsen J.H. Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study // *Clin Exp Immunol*. - 2002. - Vol.130. - P.495-500.
74. Vorechovsky I., Scott D., Haeney M.R., Webster D.A. Chromosomal radiosensitivity in common variable immune deficiency // *Mutat Res*. - 1993. - Vol.290. - P.255-264.
75. Washington K., Stenzel T.T., Buckley R.H. et al. Gastrointestinal pathology in patients with common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia // *Am J Surg Pathol*. - 2009. - Vol.20. - P.1240-1252.
76. Kalha I., Sellin J.H. Common variable immunodeficiency and the gastrointestinal tract // *Curr Gastroenterol Rep*. - 2004. - Vol.6. - P.377-383.
77. Hermans P.E., Diaz-Buxo J.A., Stobo J.D. Idiopathic late-onset immunoglobulin deficiency. Clinical observations in 50 patients // *Am J Med*. - 2008. - Vol.61. - P.221-237.
78. Hermaszewski R.A., Webster A.D. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications // *Q J Med*. - 2013. - Vol.86 - P.31-42.
79. Giovannetti A., Pierdominici M., Mazzetta F., Marziali M., Renzi C., Mileo A.M., De Felice M., Mora B., Esposito A., Carello R., Pizzuti A., Paggi M.G., Paganelli R., Malorni W., Aiuti F. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency // *J Immunol*. - 2007. - Vol.178. - P.3932-3943.
80. De Vera M.J., Al-Harthi L., Gewurz A.T. Assessing thymopoiesis in patients with common variable immunodeficiency as measured by T-cell receptor excision circles // *Ann Allergy Asthma Immunol*. - 2004. - Vol.93. - P.478-484.
81. Isgro A., Marziali M., Mezzaroma I., Luzi G., Mazzone A.M., Guazzi V., Andolfi G., Cassani B., Aiuti A., Aiuti F. Bone marrow clonogenic capability, cytokine production, and thymic output in patients with common variable immunodeficiency // *J Immunol*. -2005. - Vol.174. - P.5074-5081.
82. Arumugakani G., Wood P.M., Carter C.R. Frequency of Treg cells is reduced in CVID patients with autoimmunity and splenomegaly and is associated with expanded CD21lo B lymphocytes // *J Clin Immunol*. - 2010. - Vol.30. - P.292-300.
83. Horn J., Manguiat A., Berglund L.J., Knerr V., Tahami F., Grimbacher B., Fulcher D.A. Decrease in phenotypic regulatory T cells in subsets of patients with com-

- mon variable immunodeficiency // *Clin Exp Immunol.* – 2009. - Vol.156. – P.446–454.
84. Melo K.M., Carvalho K.I., Bruno F.R., Ndhlovu L.C., Ballan W.M., Nixon D.F., Kallas E.G., Costa-Carvalho B.T. A decreased frequency of regulatory T cells in patients with common variable immunodeficiency // *PLoS One.* – 2009. - Vol.4. – P.6269.
85. Yu G.P., Chiang D., Song S.J., Hoyte E.G., Huang J., Vanishsarn C., Nadeau K.C. Regulatory T cell dysfunction in subjects with common variable immunodeficiency complicated by autoimmune disease // *Clin Immunol.* – 2009. - Vol.131. – P.240–253.
86. Malphettes M., Gérard L., Carmagnat M., Mouillot G., Vince N., Boutboul D., Bérezné A., Nove-Josserand R., Lemoing V., Tetu L., Viillard J.F., Bonnotte B., Pavic M., Haroche J., Larroche C., Brouet J.C., Femand J.P., Rabian C., Fieschi C., Oksenhendler E. DEFI Study Group. Late-onset combined immune deficiency: a subset of common variable immunodeficiency with severe T cell defect // *Clin Infect Dis.* – 2009. - Vol.49. – P.1329–1338.
87. Herbst E.W., Armbruster M., Rump J.A., Buscher H.P., Peter H.H. Intestinal B cell defects in common variable immunodeficiency // *Clin Exp Immunol.* – 1994. – Vol.95. – P.215–221.
88. Taubenheim N., von Hornung M., Durandy A., Warnatz K., Corcoran L., Peter H.H., Eibel H. Defined blocks in terminal plasma cell differentiation of common variable immunodeficiency patients // *J Immunol.* – 2005. Vol.175. – P.5498–5503.
89. Piqueras B., Lavenu-Bombled C., Galicier L., Bergeron-van der Cruyssen F., Mouthon L., Chevret S., Debre P., Schmitt C., Oksenhendler E. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects // *J Clin Immunol.* – 2003. - Vol.23. – P.385–400.
90. Warnatz K., Denz A., Drager R., Braun M., Groth C., Wolff-Vorbeck G., Eibel H., Schlesier M., Peter H.H. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)/IgM(-)/IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease // *Blood.* – 2002. - Vol.99. – P.1544–1551.
91. Berglund L.J., Wong S.W., Fulcher D.A. B-cell maturation defects in common variable immunodeficiency and association with clinical features // *Pathology.* – 2008. – Vol.40. – P.288–294.
92. Detková D., de Gracia J., Lopes-da-Silva S., Vendrell M., Alvarez A., Guarner L., Vidaller A., Rodrigo M.J., Caragol I., Espanol T., Hernández M. Common variable immunodeficiency: association between memory B cells and lung diseases // *Chest.* – 2007. – Vol.131. – P.1883–1889.
93. Foerster C., Voelxen N., Rakhmanov M., Keller B., Gutenberger S., Goldacker S., Thiel J., Feske S., Peter H.H., Warnatz K. B cell receptor-mediated calcium signaling is impaired in B lymphocytes of type Ia patients with common variable immunodeficiency // *J Immunol.* – 2010. – Vol.184. – P.7305–7313.

94. Goldacker S., Draeger R., Warnatz K., Huzly D., Salzer U., Thiel J., Eibel H., Schlesier M., Peter H.H. Active vaccination in patients with common variable immunodeficiency (CVID) // *Clin Immunol.* – 2007. – Vol.124. – P.294–303.
95. Ko J., Radigan L., Cunningham-Rundles C. Immune competence and switched memory B cells in common variable immunodeficiency // *Clin Immunol.* – 2005. – Vol.116. – P.37–41.
96. Maródi L., Casanova J.L. Primary immunodeficiency diseases: the J Project // *Lancet.* - 2009. – Vol.373, №9682. – P.2179-2181.
97. Romberg N., Chamberlain N., Saadoun D., Gentile M., Kinnunen T., Ng Y.S., Virdee M., Menard L., Cantaert T., Morbach H., Rachid R., Martinez-Pomar N., Matamoros N., Geha R., Grimbacher B., Cerutti A., Cunningham-Rundles C., Meffre E. CVID-associated TACI mutations affect autoreactive B cell selection and activation. // *J Clin Invest.* – 2013. - Vol. 123(10). – P. 4283-4293.
98. La Cava A. Common variable immunodeficiency: two mutations are better than one.// *J Clin Invest.* – 2013. - Vol.123(10). – P. 4142-4143.
99. Rutkowska M., Trzyna E., Lenart M., Szaflarska A., Pituch-Noworolska A., Kobylarz K., Siedlar M. The elevated number of circulating regulatory T cells in patients with transient hypogammaglobulinemia of infancy is not associated with any abnormalities in the genes encoding the TGF- $\beta$  receptors. // *Clin Immunol.* – 2013. - Vol.149(1). – P. 83-85.
100. Gouilleux-Gruart V., Chapel H., Chevret S., Lucas M., Malphettes M., Fieschi C., Patel S., Boutboul D., Marson M.N., Gérard L., Lee M., Watier H., Oksenhendler E. DEFI study group Efficiency of immunoglobulin G replacement therapy in common variable immunodeficiency: correlations with clinical phenotype and polymorphism of the neonatal Fc receptor. // *Clin Exp Immunol.* – 2013. - Vol.171(2). – P. 186-194 .
101. Cavaliere F.M., Milito C., Martini H., Schlesier M., Dräger R., Schütz K., Brunetti G., Pesce A.M., Thon V., Warnatz K., Quinti I. Quantification of IgM and IgA anti-pneumococcal capsular polysaccharides by a new ELISA assay: a valuable diagnostic and prognostic tool for common variable immunodeficiency. // *J Clin Immunol.* – 2013. - Vol. 33(4). – P. 838-846.
102. Shapiro R.S..Improved IgG3 levels and reduced infection rate in a woman with CVID switched from intravenous to subcutaneous immunoglobulin therapy. // *Immunotherapy.* – 2012. - Vol.4(12). – P.1835-1839.
103. Abolhassani H., Sagvand B.T., Shokuhfar T., Mirminachi B., Rezaei N., Aghamohammadi A. A review on guidelines for management and treatment of common variable immunodeficiency. // *Expert Rev Clin Immunol.* – 2013. - Vol.9(6). – P.561-574;
104. Chen K., Coonrod E.M., Kumánovics A., Franks Z.F., Durtschi J.D., Margraf R.L., Wu W., Heikal N.M., Augustine N.H., Ridge P.G., Hill H.R., Jorde L.B., Weyrich A.S., Zimmerman G.A., Gundlapalli A.V., Bohnsack J.F., Voelkerding K.V. Germline mutations in NFKB2 implicate the noncanonical NF- $\kappa$ B pathway in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. // *Am J Hum Genet.* – 2013. - Vol.93(5). – P. 812-824.

105. Romberg N., Chamberlain N., Saadoun D., Gentile M., Kinnunen T., Ng Y.S., Virdee M., Menard L., Cantaert T., Morbach H., Grimbacher B., Cerutti A., Cunningham-Rundles C., Meffre E. CVID-associated TACI mutations affect autoreactive B cell selection and activation. // *J Clin Invest.* – 2013. - Vol.123(10). – P. 4283-4293.
106. Alachkar H., Taubenheim N., Haeney M.R., Durandy A., Arkwright P. D. Memory switched B cell percentage and not serum immunoglobulin concentration is associated with clinical complications in children and adults with specific antibody deficiency and common variable immunodeficiency. // *Clin Immunol.* – 2006. - Vol.120(3). – P. 310-318.
107. Viallard J.F., Blanco P., André M., Etienne G., Liferman F., Neau D., Vidal E., Moreau J.F., Pellegrin J.L. CD8+HLA-DR+ T lymphocytes are increased in common variable immunodeficiency patients with impaired memory B-cell differentiation. // *Clin Immunol.* – 2006. - Vol. 119(1). – P. 51-58.
108. Wehr C., Kivioja T., Schmitt C., Ferry B., Witte T., Eren E. et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. // *Blood.* – 2008. - Vol.111. – P. 77–85.
109. Bacchelli C., Buckridge S., Thrasher A.J., Gaspar H.B. Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency. // *Clin Exp Immunol.* – 2007. - Vol.149. – P. 401–409.
110. Castigli E., Wilson S.A., Garibyan L., Rachid R., Bonilla F., Schneider L. et al. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. // *Nat Genet.* – 2005. - Vol.37. – P. 829–834.
111. Pan-Hammarström Q., Salzer U., Du L., Björkander J., Cunningham-Rundles C., Nelson D.L. et al. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. // *Nat Genet.* – 2007. - Vol.39. – P.429–430.
112. Volanakis J.E., Zhu Z.B., Schaffer F.M., Macon K.J., Palermos J., Barger B.O. et al. Major histocompatibility complex class III genes and susceptibility to immunoglobulin A deficiency and common variable immunodeficiency. // *J Clin Invest.* – 1992. - Vol.89. – P. 1914–1922.
113. Olerup O., Smith C.I., Björkander J., Hammarström L. Shared HLA class II-associated genetic susceptibility and resistance, related to the HLA-DQB1 gene, in IgA deficiency and common variable immunodeficiency. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1992. - Vol.89. – P. 10653–10657.
114. Price A.L., Patterson N.J., Plenge R.M., Weinblatt M.E., Shadick N.A., Reich D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. // *Nat Genet.* – 2006. - Vol.38. – P. 904–909.
115. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A., Bender D. et al. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. // *Am J Hum Genet.* – 2007. - Vol.81. – P. 559–575.
116. Imielinski M., Baldassano R.N., Griffiths A., Russell R.K., Annese V., Dubinsky M. et al. Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. // *Nat Genet.* – 2009. - Vol.41. – P. 1335–1340.

117. Zhang L., Radigan L., Salzer U., Behrens T.W., Grimbacher B., Diaz G. et al. Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency: clinical and immunologic outcomes in heterozygotes. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2007. - Vol.120. – P. 1178–1185.
118. Shiina T., Inoko H., Kulski J.K.. An update of the HLA genomic region, loci information and disease associations. // *Tissue Antigens.* – 2004. - Vol.64. – P. 631–649.
119. International MHC and Autoimmunity Genetics Network. Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. - Vol.106. – P. 18680–18685.
120. Bridges L.C., Tani P.H., Hanson K.R., Roberts C.M., Judkins M.B., Bowditch R.D. The lymphocyte metalloprotease MDC-L (ADAM 28) is a ligand for the integrin  $\alpha 4\beta 1$ . // *J Biol Chem.* – 2002. - Vol.277. – P. 3784–3792.
121. Sheikh-Hamad D. Mammalian stanniocalcin-1 activates mitochondrial antioxidant pathways: new paradigms for regulation of macrophages and endothelium. // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2010. - Vol.298. – P. 248–254.
122. Foerster C., Voelxen M., Rakhmanov M., Keller B., Gutenberger S., Goldacker S. et al. B cell receptor-mediated calcium signaling is impaired in B lymphocytes of type Ia patients with common variable immunodeficiency. // *J Immunol.* – 2010. - Vol.184. – P. 7305–7313.
123. Karin M., Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. // *Ann Rev Immunol.* – 2000. - Vol.18. – P. 621–663.
124. Monick M.M., Mallampalli R.K., Bradford M., McCoy D., Gross T.J., Flaherty D.M. et al. Cooperative prosurvival activity by ERK and Akt in human alveolar macrophages is dependent on high levels of acid ceramidase activity. // *J Immunol.* – 2004. - Vol.173. – P. 123–135.
125. Deutsch E., Geyer G., Wenger R. *Laboratoriumsmedizin: Normalbereich der Ergebnisse und Interpretation abnormer Befunde*, 3rd ed. Basel/Munich: Karger 1992.
126. Kaplan L.A., Pesce A.J. eds. *Clinical Chemistry, Theory, Analysis and Correlation*, 3rd edition. Mosby Inc 1996.
127. Killingsworth LM, Savory J. Manual Nephelometric Methods for Immunochemical Determination of Immunoglobulins IgG, IgA, and IgM in Human Serum. // *J Clin Chem.* – 1972. - Vol.18(4). – P. 335-339.
128. Lizana J., Hellsing K. Manual immunonephelometric assay of proteins, with use of polymer enhancement. // *Clin Chem.* – 1974. - Vol.20. – P. 1181-1186.
129. NIH conference: new insights into common variable immunodeficiency / M.C. Sneller, W. Strober, E. Eisenstein [et al.] // *Ann Intern Med.* – 1993. – Vol.118.– P.720-730.
130. Di Renzo M. Common variable immunodeficiency: a review / M. Di Renzo, A.L. Pasqui, A.Auteri // *ClinExp Med.* – 2004. – Vol.3.– P. 211-217.;
131. Schaffer A.A. Deconstructing common variable immunodeficiency by genetic analysis / A.A. Schaffer, U. Salzer, L. Hammarstron, B. Grimbacher // *CurrOpin Genet Dev.* – 2007.– Vol.17.– P.201-212.

132. Hermaszewski R.A. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications/ R.A. Hermaszewski, A.D. Webster// *Q J Med.* – 1993. – Vol.86.– P. 31-42.;
133. Conley M.E. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies: representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies)/ M.E. Conley, L.D. Notarangelo, A. Etzioni // *Clin. Immunol.*– 1999.– Vol.93.– P.190-197.
134. Genomewide association identifies diverse causes of common variable immunodeficiency/ J.S. Orange, J.T. Glessner, E. Resnick [et al.] // *Allergy Clin. Immunol.*–2011.– Vol.127.– P. 1360-1367.
135. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+) IgM(-) IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease/ K. Warnatz, A. Denz, R. Drager [et al.] // *Blood.* – 2002.– Vol. 99.– P. 1544-1551.;
136. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects/ B. Piqueras, C. Lavenu-Bombled, L. Galicier [et al.] // *J Clin Immunol.* – 2003.– Vol.23.– P. 385-400.;
- Berglund L.J. B-cell maturation defects in common variable immunodeficiency and association with clinical features/ L.J.Berglund, S.W. Wong, D.A. Fulcher // *Pathology.* – 2008.– Vol. 40.– P. 288-294.
137. Alt F.W., Oltz E.M., Young F., Gorman J., Taccioli G., Chen J. VDJ recombination. // *Immunology Today.* – 2014. - Vol.11. – P. 306-214
138. Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H., Gage E.A., Massey J.M., Haynes B.F., Polis M.A., Haase A.T., Feinberg M.B., Sullivan J.L., Jamieson B.D., Zack J.A., Picker L.J., Koup R.A. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. // *Nature.* – 2010. - Vol.17. – P. 690-695.
139. van Zelm M.C., Szczepanski T., van der Burg M., van Dongen J.J. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. // *The Journal of Experimental Medicine.* – 2007. - Vol. 204. – P. 645-655.

**ИНФОРМИРОВАННОЕ ДОБРОВОЛЬНОЕ СОГЛАСИЕ  
на участие в научном проекте «РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ КОМПЛЕКСА ВЫСОКОТЕХНОЛОГИ-  
ЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ, ЛЕЧЕБНОЙ И РЕАБИЛИТАЦИОННОЙ ПОМОЩИ ДЕТЯМ И  
ВЗРОСЛЫМ С ОБЩЕЙ ВАРИАБЕЛЬНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ В РЕСПУБЛИКЕ  
КАЗАХСТАН»**

*(заполняют все пациенты, участвующие в научном проекте)*

Я (Ф.И.О пациента) \_\_\_\_\_  
 Дата рождения (число, месяц, год) \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ года  
 Ф.И.О. родителя/опекуна (если применимо) \_\_\_\_\_  
 Отношение к пациенту (если применимо) \_\_\_\_\_

В соответствии со статьями 91-94 Кодекса Республики Казахстан «О здоровье народа и системе здравоохранения» информирован(а) о состоянии своего здоровья (состоянии ребенка, подопечного), я даю добровольное согласие на проведение консультативно-диагностических процедур и манипуляций, назначаемых врачом-куратором или лечащим врачом, для установления диагноза и подбора терапии.

- Я даю добровольное на участие в научном проекте.
- Я даю добровольное согласие на использование моего биоматериала для проведения данного научного проекта и понимаю, что забор биоматериала не повлияет на мое физическое состояние.
- Я понимаю, что медицинским персоналом будут приниматься все меры для сохранения конфиденциальности информации о данных моего обследования в рамках научного проекта.

Ни при каких обстоятельствах мне не должны выполняться следующие диагностические и лечебные манипуляции / процедуры:

\_\_\_\_\_ (укажите манипуляции, если по каким-либо причинам Вы против их выполнения или Вам нельзя их выполнять)

В случае возникновения во время обследования и лечения (в том числе в ходе операции) непредвиденных осложнений, угрожающих моему здоровью, даю согласие на изменение характера лечения (в том числе объема оперативного вмешательства), включая отказ от его выполнения, с последующим информированием меня об этом.

Мне в доступной форме разъяснены альтернативные методы обследования и лечения, а также возможные последствия моего отказа от обследования и лечения.

Я могу отказаться от обследования и лечения в любой момент, даже после подписания информированного согласия, при определенных обстоятельствах (\_\_\_\_\_).

Я знаю, что в моих интересах сообщить врачу обо всех имеющихся у меня (моего ребенка, подопечного) известных мне проблемах со здоровьем, аллергиях и индивидуальной непереносимости лекарств, о наличии у меня (моего ребенка, подопечного) в прошлом или в настоящее время инфекционного гепатита, туберкулеза, ВИЧ-инфекции, а также о злоупотреблении алкоголем и/или пристрастии к наркотическим препаратам.

Я понимаю, что нарушение врачебных рекомендаций, а также сокрытие информации о состоянии моего здоровья может привести к местным и/или общим осложнениям и др.

Я ознакомлен(а) со всеми пунктами настоящего документа и согласен(а) с ними.

Подпись пациента / законного представителя \_\_\_\_\_

**Ф.И.О. врача- куратора Усенова Оксана Полатовна**

Подпись врача \_\_\_\_\_

Дата заполнения «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ года      Время заполнения      час.      мин.

*(примечание: ответственность за правильность заполнения общего информированного согласия несет пациент / его законный представитель)*

**Врач аллерголог-иммунолог Усенова Оксана Полатовна**

**Контактный телефон: 8701-418-43-94**

**Эл. адрес: oks\_14.06.1988@mail.ru**





**АЛГОРИТМ КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПАЦИЕНТОВ С ОВИН**

### Анкета первичного скрининга ОВИН

Имеются ли у Вас или Вашего ребенка следующие проявления:

№	Проявления	Да	Нет
1	Четыре или более острых отитов в течение года		
2	Два или более тяжелых синуситов в течение года		
3	Длительная, два месяца и более, антибиотикотерапия с минимальным эффектом		
4	Две или более пневмоний в течение года		
5	Повторные глубокие абсцессы кожи или внутренних органов		
6	Стойкая молочница полости рта или грибковая инфекция кожи		
7	Необходимость внутривенного введения антибиотиков для лечения инфекций		
8	Две или более глубоких инфекций, включая септицемию		
9	Наличие диагноза ПИД в семье.		
10	Наличие в семье смертей в раннем возрасте от тяжелых инфекционных заболеваний или онкологии		