

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневич

2016 г.

Регистрационный № 231-1215

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ
ТОЛЕРАНТНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНЫМИ
ИММУНОДЕФИЦИТАМИ**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ:

к.б.н. Шарапова С.О., Гурьянова И.Е., Сакович И.С., Алешкевич С.Н., д.м.н.,
профессор, член-корреспондент НАН Беларуси Алейникова О.В.

Минск, 2016

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

20.05.2016

Регистрационный № 231-1215

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ
ТОЛЕРАНТНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНЫМИ
ИММУНОДЕФИЦИТАМИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: канд. биол. наук С.О. Шарапова, И.Е. Гурьянова, И.С. Сакович,
С.Н. Алешкевич, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН Беларуси О.В. Алейникова

Минск 2016

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены методы диагностики первичных иммунодефицитов, главным компонентом которых является нарушение центральной и периферической толерантности.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-иммунологов, врачей-гематологов, врачей-педиатров, врачей-ревматологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим первичными иммунодефицитами.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АА — ацетат аммония

АЛПС — аутоиммунный лимфопролиферативный синдром

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

КМ — костный мозг

МНК — моноклеарные клетки

НК — натуральные киллеры

ПВД — первичные иммунодефициты

ПК — периферическая кровь

ПЦР — полимеразная цепная реакция

РНК — рибонуклеиновая кислота

ТКИН — тяжелый комбинированный иммунодефицит

ФСБ — фосфатно-солевой буфер

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Термоциклер (ПЦР-амплификатор) для ПЦР в реальном времени.

Центрифуга с охлаждением для пробирок объемом 15–50 мл.

ПЦР-бокс.

Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Вортекс.

Водяная баня.

Генетический анализатор для проведения капиллярного электрофореза продуктов секвенирующей реакции.

Прибор, позволяющий измерять оптические свойства индивидуальных клеток в суспензии.

Документирующая система для визуализации результатов электрофореза.

Инкубатор для клеточных культур с 5% CO₂.

Магнитная мешалка с подогревом.

Морозильник -20°C.

Спектрофотометр.

Термомиксер.

Холодильник.

Центрифуга с охлаждением на 14000 об./мин (объем пробирок 1,5–2 мл).

Дозаторы для работы с объемами растворов в диапазоне от 0,1 до 1000 мкл.

Реактивы

KCl.

MgCl₂.

NP40.

RPMI-1640.

SSC.

ДТТ.

Тaq ДНК полимеразы.

Агароза.

Бромистый этидиум.

Вода деионизованная.

Набор праймеров.

Моноклональные антитела для детекции субпопуляций лимфоцитов.

Маркер молекулярного веса.

Набор для выделения РНК.

Набор для секвенирования, содержащий флуоресцентно-меченые дидезоксинуклеотиды.

Обратная транскриптаза.

Олигонуклеотиды.

Растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ).

Раствор DAPI.

Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1).

Формальдегид 3,7%/ФСБ.

Фосфатно-солевой буфер (ФСБ).

Хлороформ.

ЭДТА, 0,125М, рН = 8,0.

ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка).

Этанол, 70%.

Этанол, 80%.

Этанол, 96%.

Расходные материалы

Наконечники для дозаторов с аэрозольными барьерами (объем — от 0,1 до 1000 мкл).

Пробирки (объем — 0,2–50 мл).

Пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА, цитратом натрия для молекулярно-биологических и иммунологических исследований).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

D81.2. Тяжелый комбинированный иммунодефицит с низким или нормальным содержанием В-клеток (Оменн синдром).

D84.9. Аутоиммунный полигландулярный синдром, тип 1 (APS-1), дефицит AIRE.

D84.8. Иммунодефицит, полиэндокринопатия, энтеропатия, сцепленная с X-хромосомой, дефицит FOXP3.

D84.8. Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром с мутацией в гене *Fas*.

D82.4. X-сцепленный лимфопролиферативный синдром.

D84.8. Синдром активации фосфоинозитид 3-киназы δ (PI(3)K) 1 типа (activated phosphoinositide 3-kinase δ (APDS1)).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Схема метода включает в себя следующие этапы:

1. Стандартное иммунологическое исследование с определением относительного содержания Т-, В-лимфоцитов и естественных киллеров методом безотмывочной технологии.

2. Углубленное типирование Т-лимфоцитов с определением тимических мигрантов, регуляторных Т-лимфоцитов, Т-лимфоцитов памяти и дважды негативных Т-лимфоцитов (ДНТ).

3. Углубленное типирование В-лимфоцитов после выделения фракции моноклеарных клеток.

4. Секвенирование генов, ответственных за нарушение центральной (*RAG1, RAG2, AIRE*) и периферической толерантности (*FoxP3, Fas, PI3CD, PI3R1, SH2D1A, XIAP*).

4.1. Подбор праймеров и условий амплификации.

4.2. Выделение ДНК.

4.3. Полимеразная цепная реакция и однонитевой конформационный полиморфизм (SSCP).

4.4. Секвенирование.

5. Диагностика синдромов с нарушением центральной толерантности:

5.1. Оменн синдром.

5.2. Аутоиммунный полигландулярный синдром, тип 1 (APS-1), дефицит AIRE.

6. Диагностика синдромов с нарушением периферической толерантности:

6.1. Иммунодефицит, полиэндокринопатия, энтеропатия, сцепленная с X-хромосомой.

6.2. Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром с мутацией в гене *Fas*.

6.3. Синдром активации фосфоинозитид 3-киназы δ (PI(3)K) 1 типа (activated phosphoinositide 3-kinase δ (APDS1)).

1. Стандартное иммунологическое исследование с определением относительного содержания Т-, В-лимфоцитов и естественных киллеров методом безотмывочной технологии

Для проведения стандартного иммунологического исследования у пациентов берут периферическую кровь в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА. Иммунофенотипирование лимфоцитов проводят методом семицветной проточной цитометрии с использованием процедуры безотмывочного лизирования

с применением моноклональных антител, конъюгированных с FITC, фикоэритрином (PE), ECD, PC-5, PC-7, APC, APC-Alexa 750. Иммунологические параметры для исследования состояния иммунной системы включают 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+).

2. Углубленное типирование Т-лимфоцитов с определением тимических мигрантов, регуляторных Т-лимфоцитов, Т-лимфоцитов памяти и дваждынегативных Т-лимфоцитов

Для стандартного иммунологического исследования у пациентов берут периферическую кровь в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА. Иммунофенотипирование лимфоцитов проводят методом семицветной проточной цитометрии с использованием процедуры безотмывочного лизирования с моноклональными антителами, конъюгированными с FITC, фикоэритрином (PE), ECD, PC-5, PC-7, APC, APC-Alexa 750. Иммунологические параметры для исследования состояния иммунной системы включают в себя следующее 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-TCR $\alpha\beta$ +).

3. Углубленное типирование В-лимфоцитов после выделения фракции мононуклеарных клеток

Для определения поверхностного иммунофенотипа В-лимфоцитов мононуклеары периферической крови выделяют на градиенте плотности Фиколл–Пака, отмывают в фосфатном буфере, инкубируют 15 мин в питательной среде RPMI-1640 при 37°C и 5% CO₂. Затем клетки осаждают и окрашивают моноклональными антителами, конъюгированными FITC, PE, PC-5, PC7.

Иммунологические параметры для углубленного определения В-лимфоцитов включают 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++).

3.1. Пример диагностики детей с синдромом Омени

Таблица 1. — Результаты стандартного и углубленного иммунологического исследования

Возраст на момент исследования	Пациент_1_ мальчик		Пациент_2_ девочка		Пациент_3_ девочка
	1 год 2 мес.	1 год 3 мес.	1 год 10 мес.	1 год 11 мес.	1 год 9 мес.
% CD3+ (кл/мкл)	13,3 (19)	15,8 (102)	92,4 (3068)	71,9 (2200)	25,9 (48)
% CD4+ (кл/мкл)	11,2 (16)	13,8 (84)	67,3 (2234)	21,6 (660)	16,9 (31)
% CD8+ (кл/мкл)	2,7 (4)	4,1 (25)	13,3 (442)	25,7 (790)	8,5 (16)
% CD19+ (кл/мкл)	23,5 (34)	14,4 (91)	5 (166)	17,6 (540)	0
% CD3+DR+ (кл/мкл)		5,9 (36)	71,6 (2377)	47,2 (1450)	16,1 (30)
% НК (кл/мкл)	64,2 (92)	69,7 (424)	2,1 (70)	7,6 (230)	66,5 (122)
% Тимические мигранты	3	0,9	0,45	0,1	0,3
% Регуляторные Т-лимфоциты	10,8	12,8	0,8	1,1	0,9
% Переключенные В-клетки памяти	н.д.	17,8	25,3	27	0
% Непереклученные В-лимфоциты памяти	н.д.	4,6	8,95	6,94	0
IgG, г/л	3,62	н.д.	11,8 (IVIg+)	н.д.	2,12
IgM, г/л	0,45	н.д.	1,86	н.д.	0,46
IgA, г/л	0,16	н.д.	0,72	н.д.	0,39

Как видно из таблицы 1, у всех детей наблюдалось снижение уровня тимических мигрантов до критических значений, а число В-лимфоцитов колебалось от полного отсутствия до нормальных возрастных значений.

3.2. Иммунологическое обследование детей с аутоиммунным полигландулярным синдромом, тип 1 (APS-1), дефицит AIRE

1. Стандартное иммунологическое обследование не выявляет нарушений в иммунитете.

2. При углубленном типировании лимфоцитов периферической крови отмечается снижение уровня тимических мигрантов и экспансия аутореактивных IgM-IgD+ В-лимфоцитов.

3.3. Результаты иммунологической диагностики IPЕХ синдрома (иммунодефицита, полиэндокринопатии, энтеропатии, сцепленной с Х-хромосомой)

1. В стандартной иммунограмме может наблюдаться повышенное число активированных Т-лимфоцитов (CD3+DR+).

2. В углубленном исследовании отмечается полное отсутствие регуляторных Т-лимфоцитов с фенотипом CD4+CD127-CD25++ (CD4+CD25++FoxP3), также имеет место редукция наивных Т-лимфоцитов с фенотипом (CD4+CD45RA+); весь пул Т-лимфоцитов был представлен Т-лимфоцитами памяти (CD4+CD45RO+).

3.4. Иммунологическое исследование детей с синдромом активации фосфоинозитид 3-киназы δ (PI(3)K) (activated phosphoinositide 3-kinase δ (APDS))

1. Уменьшение количества Т-хелперов (CD4+) и Т-регуляторных клеток (CD4+CD25+CD127-), увеличение количества эффекторных CD8+ Т-лимфоцитов.

2. Снижение или отсутствие популяции наивных Т-лимфоцитов (тимических мигрантов CD4+CD31+CD45RA+), увеличение количества клеток памяти (CD8+CD45RO+).

3. Изменения в гуморальном звене представлены увеличением количества переходных В-клеток (CD19+CD38+), синтезирующих IgM, усилением экспрессии эмбрионального маркера CD5+ на В-лимфоцитах, ограничением популяции В-клеток памяти (CD19+CD27+IgD- и CD19+CD27+IgD+).

4. Дисбаланс субпопуляций В-лимфоцитов приводит к нарушению антителопродукции: дефицит IgA и IgG, уровень IgM нормальный или повышен, снижено количество поствакцинальных антител и изогемагглютининов.

Окончательный диагноз устанавливается после обнаружения мутации в гене *PI(3)KCD*.

4. Секвенирование генов, ответственных за нарушение центральной (*RAG1, RAG2, AIRE*) и периферической толерантности (*FoxP3, Fas, PI3CD, PI3R1, SH2D1A, XIAP*)

4.1. Подбор праймеров и условий амплификации

Праймеры подбираются с учетом следующих требований, если позволяет последовательность матрицы:

Длина праймера — 18–22 нуклеотида. Температура отжига — 55–65°C. Содержание GC — 40–70%. Отсутствие на 3 конце стабильных петель. Неспособность формировать праймер-димеры со вторым праймером. Отсутствие кластеров повторяющихся нуклеотидов. Отсутствие альтернативных сайтов отжига прямого и обратного праймеров на ДНК человека в пределах одной хромосомы.

Праймеры подбирают таким образом, чтобы в ходе ПЦР амплифицировались не только последовательности экзонов, но и сплайс-сайты.

Праимеры для гена *RAG1*

Таблица 2. — Праимеры для гена *RAG1*

Название праймера	Последовательность 5-3	Длина в нуклеотидах	Температура отжига	Длина ПЦР-продукта
RAG1_1f	ATGACTTGTTTTTCATTGTTCTCAG	24	50	290
RAG1_1r	GTGGGCTTTTAACAATGGCTG	21	53	
RAG1_2f	GGCTGATGGTCAGAAGCCAG	20	55	292
RAG1_2r	TGCCTTCACATCGATCCGGA	20	55	
RAG1_3f	TCCTGGCCGGACCTCATTG	19	56	299
RAG1_3r	TGCTGACGGGCTTGTCTTG	19	55	
RAG1_4f	TCAGCCAAACTTGCAGCTCA	20	55	300
RAG1_4r	CTGCCCATGACTTTGAGGCA	20	55	
RAG1_5f	AGCATGTCTTTTGCCGGGTC	20	55	289
RAG1_5r	CTCCGAGTCAGCGACAGAAG	20	55	
RAG1_6f	CACCACATCTCAAGTCACAAGGA	23	55	337
RAG1_6r	TGTGGTACTGACTGCAGCTGA	21	55	
RAG1_7f	CTGTTTGCTTGGCCATCCGT	20	56	349
RAG1_7r	TGGGATCTCATGCCTTCCAAGA	22	55	
RAG1_8f	TGGTGTCTGCTTTGATGGACA	21	54	333
RAG1_8r	GACTCAGGATGGCAGTCAGC	20	55	
RAG1_9f	ACCTAACTCTGAACTGTGTTGCA	23	54	330
RAG1_9r	TCCAGGTTCTCAGCATGGCT	20	55	
RAG1_10f	CCCGTCTGGAAGCCTCTCAA	20	55	323
RAG1_10r	CTTCTCCGGAGATGCTTGTC	21	53	
RAG1_11f	AAAAGGTGGCAGGCCACA	18	54	349
RAG1_11r	CATGGGCCAGGGTTTTGTGAA	21	55	
RAG1_12f	TCACAGCGTTTTGCTGAGCT	20	55	335
RAG1_12r	TCCCCTAAGCTTGCCTGAGG	20	55	
RAG1_13f	GCCAGGCAGTCCAAATGCTA	20	55	263
RAG1_13r	AAGCCCTCAATGCAACCCAG	20	55	

Праимеры для гена *RAG2*

Таблица 3. — Праимеры для гена *RAG2*

Название праймера	Последовательность 5-3	Длина в нуклеотидах	Температура отжига	Длина ПЦР-продукта
RAG2_1f	ACATGTGAAGGAATCTAAATACGA	24	50	345
RAG2_1r	CCTTTGAATGTGCAAGTGCC	20	52,5	
RAG2_2f	ACCATGTCAAACCTGAAGCCT	20	51	347
RAG2_2r	GGTTCTGTGGGTAGAAGGCA	20	53	
RAG2_3f	AGGAGATGTTCTCTGAAGCCAGA	22	55	341
RAG2_3r	TACCCAGGGGAAGATCAACCC	21	55	

RAG2_4f	TGCCAATAATATCCGGCCTGC	21	55	298
RAG2_4r	TCCCATGTTGCTTCCAAACCA	21	54	
RAG2_5f	TGGAGACCCCAGATTGGACC	20	55	344
RAG2_5r	CCAGTAGCCTGTCTCAGACTCA	22	55	
RAG2_6f	TGGTGATGATGAATTTGACACCT	23	52	336
RAG2_6r	CGGAGGGATTTCATTGGAGGC	21	55	
RAG2_7f	CAGTGTCATGGATCTGGCAGA	20	54	248
RAG2_7r	CATACACCTGAATCTGAAAGGC	22	51	

Праймеры для гена *Fas*

Таблица 4. — Праймеры для гена *Fas*

Название праймера	Последовательность 5-3	Длина в нуклеотидах	Температура отжига	Длина ПЦР-продукта
Fas_1f	GTTGGTGGACCCGCTCAG	18	58,6	162
Fas_1r	CGCCCCACTTTGCCTATC	18	57,7	
Fas_2f	GGTTACACTTGTTTACCACGT	21	50,6	293
Fas_2r	TGTGCTACTCCTAACTGTGACT	22	50,6	
Fas_3f	TAGTTCACCCCTGTTACCTGC	22	59	286
Fas_3r	GGCCCCAATTTCAAATTGTC	20	57,8	
Fas_4f	GCCCACCATTTTCATAGTCTGC	22	59,4	259
Fas_4r	TCTTTAGCTTAAGTGGCCAGCA	22	58	
Fas_5-6f	CAGGCTTTTGAATTTCTCCTG	21	55,4	357
Fas_5-6r	CCCAAGTTATTTCAATCTGCAG	22	55,3	
Fas_7f	CATGCATTCTACAAGGCTG	19	51,3	172
Fas_7r	TTTCAAGGAAAGCTGATACC	20	50,9	
Fas_8f	TTGTCTTTCTCTGCTTCCA	19	50,4	103
Fas_8r	CTAAAGGATGCCATCTCTATG	21	50,6	
Fas_9f	CTTCATAGACCTTTAGGACTTAGC	24	51,9	498
Fas_9r	CACTAATTGCATATACTCAGAAGCTG	25	51,9	

4.2. Выделение ДНК из суспензии клеток

Клетки отмывают в фосфатно-солевом буфере или физиологическом растворе. После осаждения часть жидкости оставляют в пробирке (20–40 мкл), осадок клеток тщательно ресуспензируют. Лизирующий буфер добавляют в объеме 100 мкл на 1 млн; пипетируют. Лизируют при 50–60°C с перемешиванием в течение 1–24 ч. Проводят экстракцию фенол-хлороформной смесью (фен-хл-изоам.спирт 25:24:1, рН = 7,5–8,5). Фенол-хлороформную смесь добавляют в лизат в равном объеме (400 мкл на 600 мкл лизата). Центрифугируют 1 мин при 1–5000 оборотов. Отбирают верхнюю фазу. Перед второй экстракцией держат пробирку в термомиксере при +50°C в течение 10 мин. Затем к лизату добавляют 8М ацетата аммония в объеме, равном половине объема лизата. Смесь тщательно перемешивают на центрифуге. Центрифугируют при 14000 оборотах 10–20 мин с охлаждением.

Осаждение и отмывка ДНК. Добавляют равный объем изопропанола. После отбора супернатанта добавляют 70% этанол, 300 мкл, если осадка очень мало и 500–700 мкл — если осадок выраженный. Перемешивают

переворачиванием и центрифугируют при максимальных оборотах 5–10 мин. Затем жидкость отбирают, осадок высушивают в ламинаре в виде открытой пробирки, растворяют в 30–200 мкл ТЕ буфера в зависимости от количества осадка.

4.3. Полимеразная цепная реакция и однонитевой конформационный полиморфизм

ПЦР проводят в стандартных условиях: 1х ПЦР буфер с KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ, 0,5 мкМ каждого праймера, 1U Taq полимеразы. Тотальная клеточная ДНК пациента вносится в количестве 100 нг. Число циклов амплификации составляло 35. Простая ПЦР, объем — 25 мкл, ПЦР проводят на твердотельном амплификаторе.

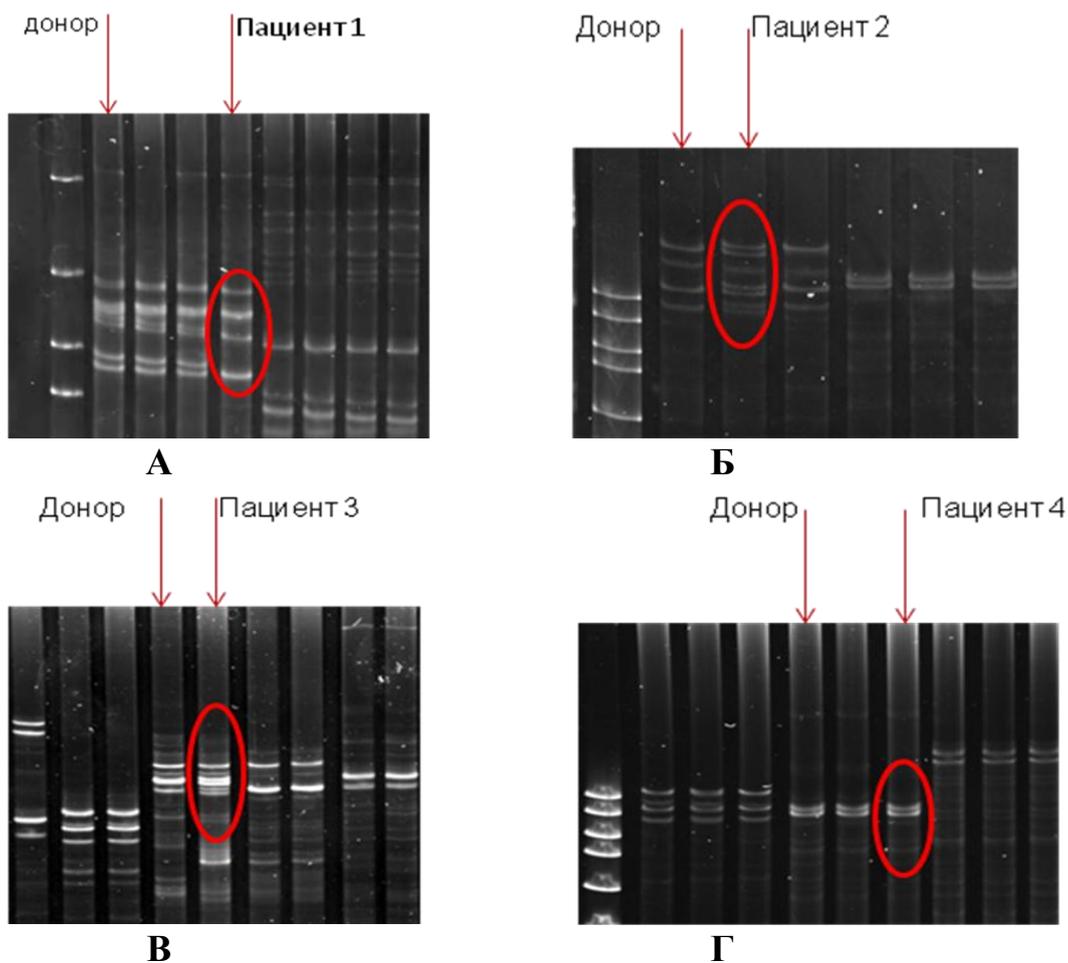
После добавления персульфата аммония и TEMED все тщательно перемешивают и в течение 5 мин заливают гель. Оставляют полимеризоваться на 1–2 ч при комнатной температуре.

Приготовление образцов. Промывают лунки геля 0,5х TBE буфером с помощью дозатора и тонкого наконечника. Ставят гель в камеру с 0,5 х TBE на 1 ч при 200 В (6–8 Вт). В это время готовят образцы для внесения в гель: смешивают в пропорции 2:1 формамид и ПЦР-продукт.

Затем ставят образец денатурировать на 5–10 мин при 95°. По окончании денатурации пробирки с денатурировавшими образцами помещают на лед (5 мин), с него же и закапывают их в лунки. Проводят электрофорез (градиентный) либо вручную: 5 мин — 50 В, 5 мин — 100 В; до 16 ч — 350 В (мощность примерно 15 Вт). Необходимым условием является постоянная температура (18–23°) в помещении на протяжении всего электрофореза. Следует избегать нагревания стекол. Длина анализируемых фрагментов 150–650 п.о.; оптимально 200–300 п.о. Окрашивание производится в 1X растворе красителя в буфере, в котором шел форез в течение 8–15 мин. Анализ выполняется на трансиллюминаторе. Полученный продукт анализируют в 1,5% агарозном геле и далее используют для SSCP (однонитевой конформационный полиморфизм) анализа в 10% полиакриламидном геле с добавлением 5% глицерола. Красят гель в растворе флюоресцентного красителя в 0,5%TBE (1:10000). Для фотосъемки используется документирующая система закрытого типа с цифровой камерой.

4.3.1. Результаты скрининга SSCP-исследования конформационного полиморфизма однонитевой ДНК по подвижности в полиакриламидном геле

Учитывая, что гены ПИД состоят из большого числа экзонов, секвенирование генов целиком проводится в крайнем случае. Стандартно генетическая диагностика начинается с SSCP (анализ конформационного полиморфизма однонитевой ДНК по подвижности в полиакриламидном геле). Для данного вида исследования необходима ДНК здорового донора и пациента (обычно собираются образцы периферической крови нескольких пациентов для экономии реагентов). Полученные результаты анализируются по отношению к контролю (образцы крови здорового лица). На рисунке представлены различные результаты SSCP.



А — представлены данные SSCP у 3-х пациентов и здорового донора при исследовании 4 экзона гена *RAG1*, как видно на фотографии электрофореграмм: у пациента 1 отсутствует 1 полоска в отличие от донора и других пациентов. Этот фрагмент был отсеквенирован, мутации не было обнаружено; Б — наблюдается отличие в подвижности ДНК пациента 2 от здорового донора, 9 экзон гена *Fas*, обнаружена мутация в гетерозиготном состоянии; В — демонстрируется изменение в подвижности ДНК пациента 3, обнаружена мутация в 5 экзоне гена *SH2D1A*; Г — видно, что у пациента 4 визуальная подвижность 4 экзона гена *PI3CD* от здорового донора не отличалась, но у этого же пациента были изменения во 2-м экзоне, а 2 и 4 экзон часто проявляют нарушения одновременно, поэтому ему был отсеквенирован и 4 экзон, мутация была обнаружена

Рисунок — Результаты SSCP при генетической диагностике ПИД

4.4. Секвенирование

Продукт ПЦР, предназначенный для секвенирования, очищается от неспецифических продуктов амплификации с использованием электрофореза в 6% полиакриламидном геле и элюируется из вырезанного фрагмента геля в ТЕ (Трис-ЭДТА)-буфере (pH = 8,0) в ходе инкубации в термомиксере при 45°C в течение 1 ч.

Далее очищенный образец используют в качестве матрицы для реакции секвенирования. Для секвенирования в каждую реакцию терминации вносилось 4 мкл ТЕ-буфера, содержащего очищенный ПЦР-продукт, 3,2 пмоль прямого или

обратного праймера, использовавшихся для ПЦР-амплификации, 9 мкл чистой воды, 4 мкл раствора терминаторов и 2 мкл буфера для секвенирования. Продукты реакции терминации очищались от невстроившихся терминаторов преципитацией этанол/ЭДТА. Капиллярный электрофорез и детекция полученных продуктов терминации осуществлялись на автоматическом капиллярном секвенаторе.

5. Диагностика синдромов с нарушением центральной толерантности

5.1. Оменн синдром

Синдром Оменн выделяют в отдельную нозологическую форму тяжелого комбинированного иммунодефицита (ТКИН), которая характеризуется фатальной генерализованной эритродермией, лимфоаденопатией, эозинофилией и глубоким иммунодефицитом. Дети обычно страдают диареей, потерей веса, повторными инфекциями. Сыпь появляется с рождения или в первые недели жизни. Волосы, брови, ресницы теряются по мере распространения сыпи. В отличие от классического ТКИН у детей наблюдаются лимфоаденопатия (в частности, подмышечных и паховых лимфоузлов), гепатоспленомегалия, высокий уровень IgE при отсутствии В-лимфоцитов, эозинофилия; количество Т-лимфоцитов может быть нормальным или даже повышенным.

Показанием для проведения секвенирования генов *RAG1* и *RAG2* является:

1. Полное отсутствие В-лимфоцитов в периферической крови и отсутствие наивных Т-лимфоцитов. (*Примечание:* при нормальном или немного сниженном содержании В-лимфоцитов, наличии клинических признаков синдрома Оменн рекомендовано секвенирование генов *RAG1* и *RAG2*).

2. Нарушение клональности Т-клеточного рецептора. (*Примечание:* при нормальной клональности рецептора, но наличии других клинических и иммунологических признаков синдрома, рекомендовано секвенирование генов *RAG*).

5.2. Аутоиммунный полигландулярный синдром, тип 1 (APS-1), дефицит AIRE

Синдром характеризуется классической триадой: кожно-слизистый кандидоз, гипопаратиреоидизм и недостаточность надпочечников.

Тип наследования: аутосомно-рецессивный, мутации в гене *AIRE*, кодирующем транскрипционный регулятор, необходимый для центральной толерантности в тимусе, локализован на 21q23.3. Аутоиммунная природа данного синдрома связана с инфильтрацией лимфоцитами органов-мишеней, а также наличием тканеспецифических антител вследствие нарушения работы аутоиммунного регулятора *AIRE* в тимусе (дефект центральной толерантности).

Клинические проявления: хронический кожно-слизистый кандидоз манифестирует в очень раннем детстве и является наиболее частым проявлением. Он поражает ногти, кожу, ротовую полость, вагинальные слизистые оболочки и слизистые оболочки пищевода. Гипопаратиреоидизм — первая эндокринная манифестация. Аутоиммунная патология в виде болезни Аддисона обычно проявляется последней, средний возраст проявления 13 лет, но есть данные о манифестации в 20 лет и старше.

На основании клинических данных делается отбор пациентов для молекулярно-генетического определения мутации в гене *AIRE*.

6. Диагностика синдромов с нарушением периферической толерантности

6.1. Иммунодефицит, полиэндокринопатия, энтеропатия, сцепленная с X-хромосомой

Первичный иммунодефицит, который поражает только мальчиков, характеризуется нарушением дифференцировки регуляторных Т-хелперов, что проявляется иммунологической дисрегуляцией в виде множественных аутоиммунных заболеваний, полиэндокрино- и энтеропатии. Тип наследования: X-сцепленный. Мутация в гене *FOXP3* выявляется на Xp11.23-q13.3. Мутация в гене *FoxP3* приводит к блоку дифференцировки регуляторных CD4+CD25+ Т-лимфоцитов. В результате нарушается супрессия активации аутореактивных Т-лимфоцитов, что приводит к изменению периферической ауто толерантности.

Манифестация заболевания происходит обычно в первые месяцы жизни, но описаны случаи так называемого «подобного» синдрома, которые могут проявляться в старшем возрасте. Основными симптомами являются инсулин-зависимый диабет первого типа, эндокринопатии, экзема, диарея.

Направление на секвенирование гена *FoxP3*:

1. В общем анализе крови (эозинофилия).
2. В иммунологическом исследовании крови (повышение уровня IgE при нормальном содержании других иммуноглобулинов, полное или частичное отсутствие регуляторных Т-лимфоцитов с фенотипом CD4+CD25+FoxP3+, субпопуляционный состав лимфоцитов в пределах нормы).

Для подтверждения диагноза рекомендован мутационный анализ гена *FoxP3*, однако мутации могут быть в области промотера, и прямое секвенирование не всегда может обнаружить их в кодирующей ДНК и сплайс-сайтах.

6.2. Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром с мутацией в гене *Fas*

Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром — генетическое заболевание, приводящее к дефекту *Fas*-зависимого апоптоза лимфоцитов, характеризующееся незлокачественной лимфопролиферацией — лимфоаденопатией, гепатоспленомегалией и аутоиммунной патологией (аутоиммунной цитопенией).

Тип наследования: аутосомно-доминантный и аутосомно-рецессивный (встречается реже и гораздо тяжелее протекает). У большинства пациентов имеют место герминативные (germline) или соматические мутации в гене *Fas*. АЛПС встречается среди мальчиков и девочек и не имеет «географической приверженности»; на сегодняшний день описываются пациенты со всего мира.

Направление на секвенирование гена *Fas*:

1. В общем анализе крови (лимфоцитоз).
2. Иммунограмма, в периферической крови ДНТ с фенотипом CD3+CD4-CD8-TCRαβ+ более 3–5%.

У пациентов с герминативной (врожденной) мутацией в гене *Fas* среди показателей клеточного иммунитета описана экспансия CD8⁺ Т-лимфоцитов, TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8-CD3⁺, TCR $\gamma\delta$ +CD4-CD8-CD3⁺, CD3+HLA-DR⁺.

Со стороны В-лимфоцитов у многих пациентов наблюдается дефицит В-лимфоцитов памяти в периферической крови и экспансия функционально «незрелых» В-лимфоцитов (CD19+CD21-CD38⁻, CD19+IgM-IgD⁺). Окончательный диагноз устанавливается после обнаружения мутации в гене *Fas*.

6.3. Синдром активации фосфоинозитид 3-киназы δ (PI(3)K) (activated phosphoinositide 3-kinase δ (APDS))

Доминантная активирующая мутация E1021K в гене *PI(3)KCD* приводит к развитию комбинированного иммунодефицита — синдрома активации фосфоинозитид 3-киназы δ (PI(3)K) 1 типа. Первые проявления синдрома начинаются в раннем детском возрасте с инфекции респираторного тракта или лимфопролиферативных изменений. Нарушение противоинфекционной резистентности у таких больных ведет к развитию серьезных осложнений. У всех пациентов формируются рецидивирующие инфекции ЛОР-органов и легких: отиты и синуситы, тонзиллиты, повторные бронхиты и пневмонии, из них с формированием бронхоэктазов. Больные с APDS1 предрасположены к инфекциям, вызываемым вирусами герпес-группы. Эпштейн-Барр и/или цитомегаловирусная инфекция развивается примерно у 70–80% пациентов. Чаше наблюдается виремия, реже — генерализация процесса. Также имеют место инфекции, вызванные *H. simplex* и *H. varicella zoster*. Описаны и поражения кожи в виде множественных бородавок, контаминация контагиозным моллюском. У части пациентов отмечаются грибковые инфекции кожи и слизистых оболочек.

Направление на секвенирование гена *PI(3)KCD*:

1. При иммунологическом обследовании выявляют уменьшение количества Т-хелперов (CD4⁺) и Т-регуляторных клеток (CD4⁺CD25⁺CD127⁻), увеличение уровня эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов.

2. Для Т-клеточного звена характерно ограничение или отсутствие популяции наивных Т-лимфоцитов (тимических мигрантов CD4⁺CD31⁺CD45RA⁺), увеличение количества клеток памяти (CD8⁺CD45RO⁺).

3. Изменения в гуморальном звене представлены увеличением количества переходных В-клеток (CD19⁺CD38⁺), синтезирующих IgM, усилением экспрессии эмбрионального маркера CD5⁺ на В-лимфоцитах, ограничением популяции В-клеток памяти (CD19⁺CD27⁺IgD⁻ и CD19⁺CD27⁺IgD⁺).

4. Дисбаланс субпопуляций В-лимфоцитов приводит к нарушению антителопродукции: дефицит IgA и IgG, уровень IgM нормальный или повышен, снижено количество поствакцинальных антител и изогемагглютининов.

Окончательный диагноз устанавливается после обнаружения мутации в гене *PI(3)KCD*.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Возможные сложности в проведении генетической диагностики первичных иммунодефицитов с нарушением центральной и периферической толерантности и способы их устранения изложены в Приложении.

Возможные сложности в проведении генетической диагностики первичных иммунодефицитов и способы их устранения

Проблемы	Способы разрешения
ПЦР не проходит	Проверить качество ДНК, очистить ДНК методом высаливания, повторить мутационный анализ на свежесыведенной ДНК
SSCP не проходит	Проверить качество реагентов и ДНК, условия проведения и температуру в помещении, повторить анализ
Реакция секвенирования не проходит	Проверить количество ДНК в образце, повторить реакцию секвенирования