



BULGARIAN ASSOCIATION OF CLINICAL IMMUNOLOGY

BULGARIAN JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY

2025, vol. 18, № 2

Editorial Board

Editor in Chief

Prof. D. Kyurkchiev, MD, DSci

Deputy Chief Editor

Prof. M. Baleva, MD, DSci

Members

Prof. E. Naumova, MD, DSci

Prof. M. Murdjeva, MD, PhD

Prof. M. Nikolova, MD, DSci

Prof. V. Sarafian, MD, DSci

Prof. F. Martinova, MD, DSci

Prof. A. Mihaylova, PhD

Prof. Sn. Mihailova, MD, PhD

Assoc. prof. Tr. Chervenkov, MD, PhD

Assoc. prof. M. Ivanova, MD, PhD

Assoc. prof. Iv. Bochev, MD, PhD

Assoc. prof. E. Konova, MD, PhD

Assoc. prof. M. Nikolova, MD, PhD

Bulgarian Journal of Clinical Immunology 2/2025

ISSN 2738-7046

Executive secretary: I. Miteva

Proofreader: I. Miteva

Computer design: D. Alexandrova

Issued by Central Medical Library, Medical University – Sofia

1 Sv. G. Sofiyski Blvd., Bg – 1431 Sofia

tel. +359 2 952 23 93, e-mail: i_miteva@cml.mu-sofia.bg

ПРАВИЛА ЗА ДОБРА МЕДИЦИНСКА ПРАКТИКА В КЛИНИЧНАТА ИМУНОЛОГИЯ

Вносител – Експертен съвет по клинична имунология и Българска асоциация по клинична имунология (БАКИ)

Източници – библиографска справка, европейски и световни консенсуси

Основна специалност – клинична имунология

Допълнителни специалности – всички специалности, свързани с диагностика и лечение на имуномедиирани заболявания

Ключови думи: имунологични показатели, вродени грешки на имунитета, автоимунни заболявания, хемопатии, репродуктивни нарушения с автоимунен компонент, инфекциозни заболявания

Авторски колектив: Доброслав Кюркчиев, Екатерина Иванова-Тодорова, Елисавета Наумова, Емилияна Конова, Искра Алтънкова, Красимира Халачева, Мариана Мурджева, Мария Николова, Маргарита Генова, Марта Балева, Невена Гешева, Снежина Михайлова, Спаска Лесичкова, Петя Янкова, Трифон Червенков, Фани Мартинова

СЪДЪРЖАНИЕ

ПРАВИЛА ЗА ДОБРА МЕДИЦИНСКА ПРАКТИКА В КЛИНИЧНАТА ИМУНОЛОГИЯ

I. Въведение в правилата за добра медицинска практика в клиничната имунология	7
II. Правила за определяне на имунологични показатели при имунодиагностика на имуномедиирани заболявания	8
1. Определяне на протеини в серум и други биологични течности: общи имуноглобулини IgM, IgG, IgA, IgG подкласове, общи и/или специфични IgE, C3 и C4 компоненти на комплемента, C1 естеразен инхибитор, активност на комплемента, криоглобулини	8
2. Определяне на моноклонални протеини	9
2.1. Установяване, идентифициране на типа и количествено определяне на моноклонални имуноглобулини IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, капа- и ламбда-леки вериги	9
2.2. Количествено определяне на свободни леки вериги и капа-/ламбда-съотношение	9
2.3. Количествено определяне на двойки тежки/леки вериги	9
3. Определяне на ревматоиден фактор (РФ), антистрептолизинов титър (АСТ) и С-реактивен протеин (CRP)	9
4. Определяне на антитела срещу цикличен цитрулиниран протеин (ССР) и мутирал цитрулиниран виментин (MCV)	10
5. Определяне на антинуклеарни антитела (ANA) в серум	10
6. Определяне на антимитохондриални антитела (AMA) в серум	11
7. Определяне на специфични автоантитела срещу различни клетъчни (нуклеарни и цитоплазмени) антигени	11
7.1. Определяне на антитела срещу различни нуклеарни антигени: dsDNA, ssDNA, Sm, RNP, ss-A (Ro), ss-B (La), хистони, nRNP/U1RNP, PCNA, RibP, Ro-52 и други	11
7.2. Определяне на миозит-специфични и миозит-асоциирани антитела срещу Mi-2 α , Mi-2 β , TIF1 γ , MDA5, NXP2, SAE1, Ku, PM-Scl 100, PM-Scl 75, Jo-1, SRP, PL-7, PL-12, EJ, OJ, Ro-52, HA, KS, Zo, SN-1A	11
7.3. Определяне на антитела срещу центромерни антигени (CENP-B, CENP-A), Scl-70, PHK полимерази (RP11, RP155), фибрларин, NOR90, Th/To, PM-Scl100, PM-Scl75, Ku, PDGFR, Ro-52, ендотелин I-R, ангиотензин II-R-1, VEGF-R	12
7.4. Антитела срещу AMA-M2, SP100, PML, gp210, LKM-1, LC-1, SLA/LP	12
8. Определяне на антинеутрофилни цитоплазмени антитела (ANCA), антипротеиназа 3 (Pr3), антимиелопероксидаза (MPO), LAMP-2	12
9. Определяне на антигладкомускулни антитела (ASMA) в серум	13
10. Определяне на антифосфолипидни антитела (APL)	13
11. Определяне на антигломерулобазално-мембранни (AGBM) антитела	13
12. Определяне на антитела към антигени на щитовидната жлеза – анти tireоглобулинови антитела (TAT), антитела срещу тиреоидна пероксидаза (TPO) и антитела срещу рецептор за TSH (TRAb)	13
13. Определяне на островноклетъчни антитела при захарен диабет тип 1 тип LADA	14
14. Определяне на инсулинови автоантитела (IAA) и инсулинови антитела (IA2)	14
15. Определяне на автоантитела към мозъчни и неврални антигени в серум и ликвор	14
16. Определяне на антитела срещу гастрални и чревни антигени	14
17. Количествено определяне на цитокини в супернатанти от стимулирани <i>in vitro</i> клетки	15
18. Определяне на спонтанна и стимулирана активация и пролиферация на лимфоцити	15
19. Определяне на процентни съотношения и абсолютен брой на лимфоцитни популации в периферна кръв	15
20. Количествено определяне на антиген-специфични CD4 ⁺ и CD8 ⁺ T-лимфоцити	16
21. Определяне на фагоцитоза и оксидативен взрив	16
22. Флоуцитометрично имунофенотипизиране на хематологични заболявания	17
22.1. Флоуцитометрично имунофенотипизиране на левкемии	17

22.2. Флоуцитометрично имунофенотипизиране на левкемизирани зрялоклетъчни лимфоидни неоплазии (лимфоми)	17
22.3. Флоуцитометрично имунофенотипизиране на плазмоклетъчни неоплазии.....	18
22.4. Флоуцитометрично имунофенотипизиране за установяване на минимална (измерима) резидуална болест	18
22.5. Флоуцитометрично определяне на дефицит на повърхностни гликозилфосфатидилинозитол-свързващи молекули при пароксизмална нощна хемоглобинурия.....	18
23. Флоуцитометрично определяне на броя CD34+ хемопоеични стволови клетки	18
24. Определяне на химеризъм след трансплантация на хемопоеични стволови клетки.....	19
25. Флоуцитометрично изследване на клетъчен цикъл и/или количество ДНК.....	19
26. Определяне на HLA системата	19
27. Определяне на циркулиращи алоантитела	19
28. Кросмач реакция	20
29. Имуноцитохимично и имунохистохимично изследване на интрануклеарни/цитоплазмени/мебрани антигени и/или генетични последователности	20
30. Определяне на инфекциозни повърхностни антигени или антитела и ДНК/РНК последователности в кръвен серум или плазма.....	20
31. Изследване на клонални пренареждания на гените на тежки имуноглобулинови вериги (IgH) и Т-клетъчни рецептори (TCR)	20
32. Изследване на TREC (кръгове за ексцизия на Т-клетъчни рецептори) и KREC (кръгове за ексцизия на капа-делетираща рекомбинация).....	21
33. Изследване на цитокини в плазма, серум, ликвор и др. биологични течности	21
III. Правила за добра медицинска практика при някои имуномедиранни заболявания.....	22
1. Правила за добра медицинска практика за диагностика и лечение на вродени грешки на имунитета (IEI)	22
2. Диагностични имунологични подходи при автоимунни заболявания.....	52
3. Правила за добра лабораторна имунологична диагностика и мониториране в хематологията	62
4. Правила за добра медицинска практика в имунодиагностиката на инфекции и инфекциозни заболявания	72
5. Алгоритъм за имуномодулиращо лечение на сензибилизирани реципиенти за органна трансплантация	79
6. Алгоритъм за диагностика и лечение при безплодие и нарушения на бременността с автоимунен и алоимунен компонент	80

I. ВЪВЕДЕНИЕ В ПРАВИЛАТА ЗА ДОБРА МЕДИЦИНСКА ПРАКТИКА В КЛИНИЧНАТА ИМУНОЛОГИЯ

Клиничната имунология е основна клинично-диагностична медицинска специалност и научна дисциплина. Диагностичната оценка на имунната функция и фенотип е от особено значение за диагностиката и мониторирането на голям брой имуномедиирани болести, в т.ч. имунодефицитните болести, автоимунните болести, доброкачествените и злокачествените хематологични болести, безплодие и нарушения на бременността с автоимунен компонент, инфекциозните заболявания и др. Задълбоченото разбиране на клиничната и лабораторната имунология е от съществено значение за ефективното управление на трансплантацията на солидни органи и хемопоетични стволови клетки. В допълнение, имунодиагностиката е от решаващо значение за манипулирането на имунната система чрез използването на биологични и други фармакологични модификатори на имунния отговор в различни клинични аспекти.

Поради критичната си позиция в болничната среда, лабораторията по клинична имунология е основно място за имунологично изследване на пациенти от почти всяка клинична специалност. Обхватът на клиничната имунология е широк, с голямо значение за педиатрията, ревматологията, инфекциозните болести, пулмологията, дерматологията, алергологията, нефрологията, гастроентерологията, неврологията, кардиологията, хематологията и онкологията. Лабораторията по клинична имунология предоставя резултати и интерпретация на резултатите; клиничният имунолог интерпретира резултати, консултира и предлага диагностични решения на клиничните казуси.

В настоящото ръководство за добра медицинска практика, което е взимствано от опита на други страни при изготвяне на правила и насоки, свързани с диагностиката и мониторирането на различни имуномедиирани заболявания, сме се постарали да адаптираме подходите и процедурите към нашия опит, условия и традиции.

В ръководството са обособени два раздела:

1. Правила за определяне на имунологични показатели при имунодиагностика на имуномедиирани заболявания.

2. Правила за добра медицинска практика при някои имуномедиирани заболявания.

При изготвянето на правилата се базираме на повече от двадесетгодишен опит в областта на имунодиагностиката, както и на опита от прилагане на системата за външна оценка на качеството за стандартизация на методите в клиничната имунология.

Настоящото ръководство е предназначено за клиничните медицински специалисти с цел запознаване с капацитета и спецификата на дейността на лабораторията по клинична имунология и експертизата на клиничния имунолог в областта на диагностиката и мониторирането на имуномедираните болести.

II. ПРАВИЛА ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ИМУНОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ИМУНОДИАГНОСТИКА НА ИМУНОМЕДИИРАНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

1. Определяне на протеини в серум и други биологични течности: общи имуноглобулини IgM, IgG, IgA, IgG подкласове, общи и/или специфични IgE, C3 и C4 компоненти на комплемента, C1 естеразен инхибитор, активност на комплемента, криоглобулини

Описание: Лабораторията по клинична имунология трябва:

- да е в състояние да определя количеството на общите серумни имуноглобулини от класовете IgM, IgG и IgA; подкласовете на IgG; C3 и C4 компонентите на комплемента и C1 естеразен инхибитор чрез нефелометрия, турбидиметрия и други утвърдени методи;
- да определя функцията на C1 естеразен инхибитор с хромоген-субстратни или други утвърдени методи;
- да определя активност на комплемента (класически път – CH50) чрез турбидиметрия, имуноензимен (ИЕМ) и други утвърдени методи.
- да изследва общите IgE и/или специфични IgE чрез имуноензимни, флуориметрични, хемилуминесцентни и други утвърдени методи.

Показания и интерпретации при определянето на имуноглобулините и фракциите на комплемента: серумните имуноглобулини са понижени при вродени грешки на имунитета и вторични имунодефицити; IgG са увеличени в хроничната фаза на възпалението, при автоимунни болести, при IgG миелом; IgM са увеличени в острата фаза на възпалението, при IgM миелом, в острата фаза на автоимунните болести; IgA е увеличен при хронични чернодробни болести, IgA гломерулонефрит, васкулит на Schönlein-Henoch; C3, C4, CH50 са намалени при първични комплементни дефицити и при имунокомплексни автоимунни заболявания; дефицит на C4 и C1 естеразния инхибитор се установява при наследствения ангиоедем; повишени общи IgE и/или специфичните IgE се доказват в серума на болни с алергични болести и паразитози. По-редки състояния, свързани с увеличени серумни нива на IgE са хипер-IgE синдром, синдром на Wiskott-Aldrich, IPEx синдром, хронични гъбични инфекции, HIV, ходжкинов лимфом и други лимфопролиферативни заболявания, системен лупус еритематозус (СЛЕ), синдром на Чърг-Щраус (EGPA – еозинофилна грануломатоза с полиангиит), хиперееозинофилен синдром и др.

Лабораторията по клинична имунология трябва да е в състояние да определя количеството и качествения състав на криоглобулините в серума. Изследването изисква вземане на кръвна проба в предварително затоплена на 37°C епруетка без антикоагулант и съхранява на тази температура по време на подготовката на теста. След това се центрофугира и отделеният серум се поставя в хладилник (4°C) за седем дни. Пробата се проследява ежедневно за появата на имунокриопреципитат – качествено определяне на криоглобулини. След центрофугиране на 4°C криопреципитатът може да бъде измерен с калибровъчна епруетка, разтворен отново на 37°C и изследван за определяне на изотипа и клоналността.

Показания: автоимунни болести, злокачествени хемопатии, хронични инфекции, есенциална криоглобулинемия.

2. Определяне на моноклонални протеини

Парапротеинът е моноклонален имуноглобулин или имуноглобулинова лека верига (протеин на Bence Jones), присъстващ в кръвта или урината и е продукт на клонална пролиферация на зрели В-клетки, най-често плазмоцити или В-лимфоцити. Алтернативни термини включват моноклонален протеин или M-band. Парапротеините се характеризират с хомогенна миграция при електрофореза и експресия на един тип лека верига – или κ , или λ .

2.1. Установяване, идентифициране на типа и количествено определяне на моноклонални имуноглобулини IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, капа- и ламбда-леки вериги

Описание: Парапротеин може да се идентифицира в различни ситуации с различно клинично значение – от изявена злокачествена клонална пролиферация на плазмени клетки, водеща до множествен миелом, до гамапатия с малко клинично значение. Парапротеините са относително честа лабораторна находка при възрастни индивиди – срещат се при 3.2% над 50-годишна възраст и над 5% над 70, по-често при мъже. Изследвания за установяване и идентифициране на типа представляват задължителен компонент от диагностиката на плазмоклетъчния миелом. Количество < 30 g/l при липса на други диагностични критерии определят състояние, наречено моноклонална гамапатия с неизяснено значение (MGUS), а > 30 g/l – асимптоматен (тлеещ) миелом. При наличие на други диагностични критерии за мултиплен миелом се допускат вариабилни стойности на количеството. Парапротеин може да бъде установен и при други В-клетъчни лимфоидни неоплазии.

Индикации: В-клетъчни и плазмоклетъчни неоплазии.

Методи: белтъчна електрофореза, имунна електрофореза, имунофiksация.

2.2. Количествено определяне на свободни леки вериги и капа-/ламбда-съотношение

Описание: В 15% от случаите с плазмоклетъчен миелом единственият присъстващ М-протеин може да е моноклонална имуноглобулинова лека верига. Такива случаи биха се пропуснали, ако диагностиката се основава само на белтъчна електрофореза на серум. Количественото определяне на свободните капа- и ламбда-леки вериги, секретирани от плазмените клетки, в серум и урина са важен компонент за диагнозата. Абнормното капа-/ламбда-съотношение предполага излишък от единия тип лека верига и въпреки че механизмът е все още неизяснен напълно, този показател може да се използва като сурогатен маркер за клонална експанзия.

Индикации: В-клетъчни и плазмоклетъчни неоплазии, амилоидоза.

Методи: Нефелометрия или турбидиметрия.

2.3. Количествено определяне на двойки тежки/леки вериги

Описание: С използване на антитела, които са специфични за уникалните епитопи на местата на свързване, обхващащи имуноглобулиновите константни региони на тежката и на леката верига, каквито са разработени за 3-те основни имуноглобулина (т.е. IgG κ , IgG λ , IgA κ , IgA λ , IgM κ и IgM λ), е възможно прецизно измерване на цели имуноглобулинови вериги и определяне на съотношението (напр. IgG κ /IgG λ), чрез което да се осигури количествена оценка на евентуална клоналност; както и да се оцени имunosупресията на нетуморните имуноглобулинови вериги.

Индикации: В-клетъчни и плазмоклетъчни неоплазии.

Методи: Нефелометрия или турбидиметрия.

3. Определяне на ревматоиден фактор (РФ), антистрептолизинов титър (АСТ) и С-реактивен протеин (CRP)

Описание: РФ е автоантитяло, насочено най-често към Fc фрагмента на собствения IgG, което може да бъде от класове IgM, IgG или IgA. Повечето методи откриват IgM-РФ. РФ отсъства при около 15% от пациентите с ревматоиден артрит, а около 15% от здравите индивиди могат да бъдат РФ положителни в

нисък титър. РФ се открива и при други автоимунни болести – синдром на Съогрен, СЛЕ, криоглобулинемия, при белодробни болести като интерстициална фиброза и силикоза и различни инфекциозни заболявания.

АСТ открива специфични антитела, насочени срещу стрептолизин О – извънклетъчен ензим на β -хемолитичния стрептокок от група А (*Streptococcus pyogenes*). Увеличени титри се свързват с остър фарингит, скарлатина, гломерулонефрит, еризипел, ревматизъм, бактериален ендокардит и хорея на Sydenham.

CRP е основен острофазов протеин, важен за диагнозата на остро и хроничното възпаление.

Методи за изследване: използват се утвърдени техники: латекс-аглутинация, имунотурбидиметрия, нефелометрия, ИЕМ (ELISA), хемилуминесценция.

Показания: вродени грешки на имунитета и вторични имунни дефицити, АИЗ, инфекции.

4. Определяне на антитела срещу цикличен цитрулиниран протеин (CCP) и мутирал цитрулиниран виментин (MCV)

Описание: Анти-CCP и анти-MCV са биомаркери за диагностика на ревматоиден артрит (РА). Присъствието на тези автоантитела в серума на пациента има около 95% специфичност за диагнозата РА, с чувствителност, равна на тази на РФ. Тестването на двете антитела едновременно е препоръчително за изключване на диагнозата РА. Анти-CCP и анти-MCV се откриват също при някои форми на ювенилен артрит, псориаатричен артрит, реактивен артрит, СЛЕ, синдром на Съогрен, припокриващи (overlap) синдроми, възпалителни миопатии и активна туберкулоза.

Методи за изследване: Използват се утвърдени техники като хемилуминесценция, ELISA и/или имуноблот (за наличие и/или количество на антитела срещу CCP, MCV).

Показания: вродени грешки на имунитета и вторични имунни дефицити, АИЗ, инфекции.

5. Определяне на антинуклеарни антитела (ANA) в серум

Описание: Автоантителата към нуклеарни антигени реагират с нуклеарни клетъчни компоненти – нуклеинови киселини, хистони, хроматин, рибонуклеопротеини, ензими, участващи в процесите на репликация, транскрипция и трансляция, и др. Изследването на общи ANA е основен скриниращ подход в диагностиката на системните автоимунни заболявания, но ANA се срещат и при някои орган-специфични автоимунни заболявания (например автоимунен хепатит, автоимунен тиреоидит и др.), както и при около 5% от здравата популация.

Показания: системен лупус еритематозус; лекарствено индуциран лупус, синдром на Sjögren, прогресивна системна склеродермия, полимиозит/дерматомиозит, смесена съединителнотъканна болест; ревматоиден артрит, ювенилен ревматоиден артрит, хроничен активен хепатит, хроничен персистиращ хепатит, остър вирусен хепатит, първична билиарна цироза, автоимунен хепатит. Значимостта на изследването на ANA е представена на табл. 1.

Методи за изследване: Използват се утвърдени техники като индиректна имуофлуоресценция (ИИФ) върху препарати от клетъчни линии (HEp2, HEp2000 или други стандартизирани такива) или тъканни животински срези (черен дроб/бъбрек от мишка или комбинация от черен дроб, стомах и бъбрек от плъх), както и имуноензимен тест за скрининг на ANA. Индиректната имуофлуоресценция на серум от пациент се определя като „златен стандарт”. Определя се титър и по възможност тип светене спрямо критериите на International consensus of ANA pattern (ICAP) или алтернативно се използва имуноензимен метод – ELISA (за наличие и/или количество на ANA). Предимство на ИИФ за определяне на ANA е определянето на специфични флуоресцентни образи, които предполагат клинична асоциация с определени заболявания и насочват последващото разширено изследване за специфичността на ANA – т.нар. ANA типирание. Чувствителността на ANA/ИИФ на субстрат HEp-2 е достатъчно висока за идентифициране на мнозинството от клинично значимите автоантитела при разреждане на серума в титър над 1/160.

Таблица 1. Значимост на изследването на ANA при някои заболявания*

Заболяване	Значимост
СЛЕ	+++
Лекарствено индуциран лупус	+++
Синдром на Sjögren	+++
Прогресивна системна склеродермия	+++
Полимиозит/дерматомиозит	+
Смесена съединителнотъканна болест	+++
Ревматоиден артрит	+
Ювенилен ревматоиден артрит	++
Хроничен активен хепатит	++
Остър вирусен хепатит	+
Първична билиарна цироза	+
Автоимунен хепатит	+++

* 3 + най-висока значимост; * 1 + най-ниска значимост

6. Определяне на антимитохондриални антитела (АМА) в серум

Описание: Антимитохондриалните антитела (АМА) са автоантитела със специфичност към митохондриални антигени (M1-M6).

Показания за изследване: при съмнение за първична билиарна цироза.

Методи за изследване: индиректна имуофлуоресценция (наличие и титър) на срез от плъши черен дроб/бъбрек/стомах като скриниращ метод за наличие на АМА.

7. Определяне на специфични автоантитела срещу различни клетъчни (нуклеарни и цитоплазмени) антигени

7.1. Определяне на антитела срещу различни нуклеарни антигени: dsDNA, ssDNA, Sm, RNP, ss-A (Ro), ss-B (La), хистони, nRNP/U1RNP, PCNA, RibP, Ro-52 и други

Описание: Антителата срещу двойноверижна ДНК са важен маркер в диагнозата и мониторирането на системен лупус, но се срещат и при пациенти с други ревматични заболявания и хроничен активен хепатит, обикновено в нисък или умерен титър. Анти-Sm са високоспецифични за СЛЕ, но се откриват само в около 25% от пациентите. Анти-U1RNP се откриват при пациенти със СЛЕ, системна склероза и при пациенти със смесена съединителнотъканна болест (ССТБ). Анти-SSA, анти-SSB се доказват предимно при пациенти със синдром на Съогрен и някои форми на лупус, напр. кожен лупус (предимно с фоточувствителност и понякога с васкулити). Присъствието на анти-SSA и анти-SSB се асоциира с неонатален лупус, при който трансплацентарният трансфер на тези антитела (майчини IgG) може да причини преходни фоточувствителност и обрив и/или конгенитален сърдечен блок. Анти-PCNA, анти-RibP могат да насочват към различни клинични прояви на СЛЕ – съответно бъбречно засягане или невролупус. Антителата срещу хистони и ssDNA често се асоциират с лекарство индуциран лупус. При наличието на антитела срещу Ro-52 по правило се касае за по-тежко протичане на заболяването.

Методи за изследване: използват се утвърдени техники, като хемилуминисценция, ELISA и/или имуоблот и други. Скринирането на dsDNA с ELISA предлага висока чувствителност и специфичност за СЛЕ. ИИФ използва като таргетен антиген *Crithidia luciliae*, камшичеста протозоа със специфичен малък ДНК съдържащ органел – кинетопласт.

7.2. Определяне на миозит-специфични и миозит-асоциирани антитела срещу Mi-2α, Mi-2β, TIF1γ, MDA5, NXP2, SAE1, Ku, PM-Scl 100, PM-Scl 75, Jo-1, SRP, PL-7, PL-12, EJ, OJ, Ro-52, HA, KS, Zo, SN-1A

Описание: Част от тези автоантитела се наричат миозит-специфични поради високата си специфичност за автоимунни възпалителни миопатии (миозити), докато други са миозит-асоциирани.

Показания: Изследват се при съмнение за дерматомиозит, полимиозит, миозит с включвания, паранеопластичен миозит и припокриващи (overlap) синдроми. Друга част от тях са миозит-асоциирани, тъй като се срещат и при антисинтеазен синдром, както и при различни форми на overlap. Анти-Jo-1 е най-често откриваното автоантитяло в групата на възпалителните миопатии и антисинтеазен синдром. Част от автоантителата като TIF1 γ и NXP2 често се асоциират с паранеопластично индуцирани миопатии, а други – с белодробно интерстициално засягане (анти-Ku).

Част от автоантителата (Ku, PM-Scl 100, PM-Scl 75) са типични за припокриващи синдроми и форми на автоимунните заболявания

Методи за изследване: Използват се утвърдени техники като имуноензимен метод – хемилуминисценция, ELISA и/или имуноблот

7.3. Определяне на антитела срещу центромерни антигени (CENP-B, CENP-A), Scl-70, РНК полимерази (RP11, RP155), фибриларин, NOR90, Th/To, PM-Scl100, PM-Scl75, Ku, PDGFR, Ro-52, ендотелин I-R, ангиотензин II-R-1, VEGF-R

Описание: Тези автоантитела са асоциирани с различни форми на системна склероза и overlap с участие на системна склероза. Изследването им се извършва при съмнение за системна склероза (ограничена и дифузна форма), локализирана склеродерма, системна склероза без склеродерма и припокриващи (overlap) синдроми.

Показания: тези автоантитела са с висока специфичност за различни форми на склеродермия. Анти-PM-Scl100 е характерно антитяло за overlap между системна склероза и автоимунен миозит. Антителата срещу центромери се асоциират с локализираната форма на системна склероза, както и с белодробно засягане. Антителата срещу Scl-70 са свързани с тежка дифузна форма. Антителата срещу ендотелин I-R, ангиотензин II-R-1, VEGF-R, имат значение както в имунодиагностиката, така и в имунопатогенезата на системната склероза.

Методи за изследване: Използват се утвърдени имуноензимни техники като хемилуминисценция, ELISA и/или имуноблот и други.

7.4. Антитела срещу AMA-M2, SP100, PML, gp210, LKM-1, LC-1, SLA/LP

Описание: Тези автоантитела са както органонеспецифични – антимитохондриални антитела M2 (AMA-M2), така и органоспецифични – срещу антигени на чернодробни и бъбречни микрозоми (анти-LKM-1), антитела срещу разтворим чернодробен антиген (анти-SLA-LP), антитела срещу чернодробен цитозол (анти-LC). Използват се като панел за диференциална диагноза на автоимунните чернодробни заболявания.

Показания: при съмнение за автоимунни хепатити, първичен билиарен холангит (първична билиарна цироза), първичен склерозиращ холангит.

Методи за изследване: индиректна имунофлуоресценция – ИИФ и/или имуноензимен метод – ELISA и/или имуноблот, или хемилуминисценция.

8. Определяне на антинеутрофилни цитоплазмени антитела (ANCA), антипротеиназа 3 (Pr3), антимиелопероксидаза (MPO), LAMP-2

Описание: Определя се наличие, специфичност (според официално приетата номенклатура) и титър/количество на ANCA, които могат да са антитела срещу протеиназа 3 (Pr3), миелопероксидаза (MPO), LAMP-2. ANCA са важни маркери за диагнозата и активността на автоимунните васкулити от групата на т.нар. ANCA асоциирани васкулити. Описват се различни флуоресцентни образи (pANCA, атипични pANCA, cANCA, xANCA) с различни клинични асоциации. cANCA най-често се асоциират с грануломатоза на Wegener, микроскопски полиангиит и Churg-Strauss синдром. pANCA първоначално са описани при микроскопски полиангиит и Churg-Strauss синдром, но се наблюдават и при други видове васкулити, свързани с възпалителни чревни заболявания (IBD), системен лупус еритематозус, ревматоиден артрит, ювенилен артрит, припокриващи (overlap) синдроми и др. Антигенните епитопи на ANCA, важни за откриване на васкулити, са Pr3 и MPO. Антипротеиназа 3-антителата са с висока

специфичност за грануломатоза на Wegener, докато антимиелопероксидаза са с висока специфичност за микроскопичен полиангиит и в по-малка степен за синдром на Churg-Strauss. Антителата срещу GBM са специфични за синдрома на Goodpasture.

Методи за изследване: използват се утвърдени методи като ELISA и/или имуноблот, и/или хемилуминисценция и индиректна имунофлуоресценция. Индиректната имунофлуоресценция на ANCA определя титър и по възможност тип светене (pANCA, атипични pANCA, cANCA, xANCA). ELISA и/или имуноблот се използват за установяване на наличие и/или количество на антитела срещу Pr3, MPO, LAMP-2, GBM.

9. Определяне на антигладкомускулни антитела (ASMA) в серум

Описание: Антигладкомускулните антитела имат няколко таргетни антигена, намиращи се във филаментите на гладките и напречнонабраздените мускули (актин, миозин, тропомиозин, тропонин, жиментин, деснин, цитокератин и туболин).

Показания: при съмнение за автоимунни хепатити, предимно тип 1.

Методи за изследване: индиректна имунофлуоресценция (наличие и титър) на срез от плъщи черен дроб/бъбрек/стомах като скриниращ метод за наличие на ASMA.

10. Определяне на антифосфолипидни антитела (APL)

Описание: Това са серумни автоантитела, които могат специфично да се свързват с фосфолипиди и/или фосфолипид-свързващи протеини (cardiolipin (diphosphatidylglycerol), phosphatidylserine, phosphatidylcholine, phosphatidylinositol, phosphatidyl-ethanolamine, sphingomyelin, белтъчни кофактори – β 2-glycoprotein-I (β 2GPI), prothrombin и др.). Най-често в клиничната практика се изследват антикардиолипинови антитела (aCL) и анти- β 2GPI от клас IgG и IgM, както и лупусният коагулант (LA). Съгласно International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS) антикардиолипиновите антитела (aCL) и анти- β 2GPI трябва да са в средно висок или висок титър (т.е. > 40 GPL или MPL, или > 99-я перцентил). LA се изследва съгласно препоръките на International Society on Thrombosis and Haemostasis (Scientific Subcommittee on Las/phospholipid-dependent antibodies). Препоръчва се и трите антитела да се изследват два или повече пъти, с интервал от най-малко 12 седмици.

Антифосфолипидни антитела се откриват и при пациенти с различни инфекции без признаци на антифосфолипиден синдром.

Показания: първичен и вторичен антифосфолипиден синдром, включително в контекста на ПИД, ВИД, инфертилитет и АИЗ.

Методи за изследване: хемилуминисценция, имуноензимен метод – ELISA с полуавтоматични (полуавтоматични) и автоматични платформи за изследване.

11. Определяне на антигломерулобазално-мембранни (AGBM) антитела

Антигломерулобазално-мембранните антитела са със специфичност към колаген тип IV.

Показания за изследване: при съмнение за бързо прогресиращ гломерулонефрит със или без белодробни хеморагии (синдром на Goodpasture).

Методи за изследване: индиректна имунофлуоресценция (наличие и титър) на срез от маймунски бъбрек и/или имуноензимни методи ELISA/имуноблот и/или хемилуминисценция.

12. Определяне на антитела към антигени на щитовидната жлеза – анти tireоглобулинови антитела (TAT), антитела срещу тиреоидна пероксидаза (TPO) и антитела срещу рецептор за TSH (TRAb)

Показания: автоимунни заболявания на щитовидната жлеза (лимфоцитарен тиреоидит, базедова болест) и други нетиреоидни автоимунни състояния като ревматоиден артрит, тип 1 захарен диабет, цъолиакция.

Методи за изследване: ELISA, електрохемилюминесценция, ИИФ (за анти-Tg и анти-TPO) или други утвърдени техники. Определят се наличие и концентрация на TAT, TPO или TRAb антитела.

13. Определяне на островноклетъчни антитела при захарен диабет тип 1 тип LADA

Описание: Това са антитела срещу цитоплазмата на островните клетки (ICA), антитела срещу декарбоксилазата на глутаминовата киселина (GADA), антитела срещу 65 kD изоформа (GAD 65).

Показания: при съмнение за захарен диабет тип 1; някои неврологични нарушения като Stiff person syndrome.

Методи за изследване: ИИФ (за ICA), радиоимунологични техники (златен стандарт за антиинсулинови антитела, но може да определя и други автоантитела при диабет тип 1) или ELISA, или хемилюминесценция (за GADA, IA2 and ZnT8A). Определят се наличие и концентрация на автоантителата.

14. Определяне на инсулинови автоантитела (IAA) и инсулинови антитела (IA2)

Описание: Тази група обхваща автоантитела срещу инсулин (IAA), инсулинома-асоциирани автоантитела – срещу тирозин фосфатаза (insulinoma-associated protein 2 – IA2), антитела срещу цинковия йонен транспортер (ZnT8A), антитела срещу декарбоксилазата на глутаминовата киселина (GADA), антитела срещу 65 kD изоформа (GAD 65).

Показания: при съмнение за захарен диабет тип I.

Методи за изследване: радиоимунологични техники (златен стандарт за антиинсулинови антитела, но може да определя и други автоантитела при диабет тип 1) или ELISA, или хемилюминесценция (за GADA, IA2 and ZnT8A). Определят се наличие и концентрация на автоантителата.

15. Определяне на автоантитела към мозъчни и неврални антигени в серум и ликвор

Описание: Определят се антитела към антигени от централна и периферна нервна система – миелин, миелин базичен протеин (MBP), протеолипиден протеин (PLP), миелин-олигодендроцитен гликопротеин (MOG), миелин-асоцииран гликопротеин (MAG), аквапурин 4 (AQ4), N-метил d-аспартатрецептор (NMDAR), контактин-асоцииран протеин-2 (CASPR2), ганглиозиди GM1, GD1b, S100 протеин, ацетилхолинови рецептори, калциеви канали, церебрални клетки, цитоплазмения антиген Yo, антинуклеарните Hu, Ri, неврофиламенти, синаптозони, глутаматергични рецептори, глутамат декарбоксилаза (GAD), β -интерферон, SOX1, Zic4, RMV/CV2, амфифизин и други.

Показания: автоимунни енцефалити (предимно NMDAR), мултиплена склероза, паранеопластични психиатрични нарушения (при дребноклетъчен белодробен рак, тимом, невробластом, овариален карцином, рак на млечната жлеза и др.).

Методи за изследване: имуноензимни, хемилюминесценция, радиоимунологични, имуноблот, индиректна имуофлуоресценция.

16. Определяне на антитела срещу гастрални и чревни антигени

Описание: Тук се включват антиинтринзич фактор, антипариетални клетки (APA), антитела срещу тъканна трансглутаминаза (ATTG), антиендомизиумни антитела (EMA), антиглиадинови (АГЛА), анти-Saccharomyces cerevisiae (ASCA), антиретикулин автоантитела – IgG и IgA изотип.

Показания: антиинтринзич фактор и антипариетално клетъчни антитела – при съмнение за автоимунен гастрит, пернициозна анемия и други автоимунни заболявания (болест на Адисон, автоимунен тиреоидит, инсулинозависим диабет, първична овариална дисфункция); АТГА, ЕМА, АГЛА – при глутенова ентеропатия, вродена атаксия; ASCA – при болест на Крон (БК) и улцерозен колит (УК). За диференциална диагноза на БК и УК се препоръчва едновременно определяне на ASCA и ANCA (при УК се позитивират предимно ANCA, докато при БК – ASCA).

Методи за изследване: имуноензимни – ELISA, хемилуминисценция, имуноблот. Определят се наличие и титър/количество на автоантителата от IgA и IgG изотип.

17. Количествено определяне на цитокини в супернатанти от стимулирани *in vitro* клетки

Описание: Концентрацията на повечето цитокини в плазмата/телесните течности на здрави индивиди е под нивото на детекция със съвременните методи за изследване. Повишени концентрации на един/повече цитокини могат да се наблюдават във връзка с различни патологични състояния. Способността за секреция на един/повече цитокини обикновено се оценява в супернатанти от стимулирани *in vitro* клетки. Методите за определяне на IFN γ , освободен в отговор на *in vitro* стимулация с пептиди, специфични за *M. tuberculosis*, се означават като IGRA (Interferon gamma release assays).

Показания: съмнение за имуноензимен дефицит, засягащ цитокинови пътища на сигнализиране, системни автоимунни заболявания; доказване/отхвърляне наличието на инфекция.

Методи за изследване: имуноензимен (ELISA, ELISPOT), флоуцитометричен или друг мултиплексен анализ (напр. хемилуминисценция). За стимулация се използват митогени и/или специфични антигени по валидирана методика и при спазване на общоприетите изисквания за стерилност. При IGRA активацията се извършва за срок от 16-20 ч на 37 °C, 5% CO $_2$. Оценката може да се извърши на ниво цяла периферна кръв, единична моноклеарна клетка (ELISPOT) или конкретни лимфоцитни популации, при условие че се използват допълнителни методи за клетъчно сепариране или съответни активатори. При някои варианти на IGRA се използват пептиди, стимулиращи поотделно антиген-специфични CD4 и CD8 T-лимфоцити. Супернатантите, получени след стимулация, могат да се съхраняват замразени продължително време, съгласно инструкциите на производителя.

18. Определяне на спонтанна и стимулирана активация и пролиферация на лимфоцити

Описание: Спонтанната и стимулираната *in vitro* активация отразяват способността на лимфоцитите за провеждане на сигнали през антиген-специфичния и костимулиращите рецептори и за осъществяване на функциите си, както и за обратното им регулиране.

Показания: съмнение за първичен имуноензимен дефицит, засягащ сигнални пътища и молекули; вторичен имуноензимен дефицит с различен произход; системни автоимунни заболявания с нарушена обратна регулация на лимфоцитната активация, хронични инфекции.

Методи за изследване: Многопараметърна флоуцитометрия, с комбинация от моноклонални антитела за установяване коекспресията на повърхностни активационни маркери (напр. CD69, CD25, CD38, CD134, CD137, CD154 или комбинации от тях) и едно или две антитела за определяне вида на активираната лимфоцитна субпопулация (напр. CD3, CD3/CD4, CD3/CD8). Изследването включва задължително нестимулирана и изотипна контрола. *In vitro* активацията се извършва по валидирана методика, с неспецифичен стимулатор (фитохемаглутинин, PMA/йономицин, анти-CD3 антитяло, анти-CD2 антитяло) и продължителност в зависимост от целта на изследването: Срокът на стимулиране варира от 4 ч (ранни активационни маркери) до 5 дни (антиген-специфична пролиферация), при спазване на общоприетите изисквания за стерилност.

19. Определяне на процентни съотношения и абсолютен брой на лимфоцитни популации в периферна кръв

Описание: Минималният панел включва: общи (CD3+) T-лимфоцити, CD3+CD4+ и CD3+CD8+ T-клетъчни субпопулации и тяхното съотношение, В-лимфоцити (CD19+), CD3-CD16+CD56+NK клетки. Всяка лаборатория може да използва допълнителни комбинации от моноклонални антитела за изследване на други маркери (клетъчни субпопулации) за нуждите на диагностично-лечебния процес.

Показания: вродени грешки на имунитета и вторични имунни дефицити, хронични и рецидивиращи инфекции, онкологични и хематологични заболявания, репродуктивни неуспехи.

Метод за изследване: Флоуцитометрично имунофенотипизиране посредством съответно валидирана дву-, три- и/или многопараметърна имунофлуоресценция. Двухцветното имунофенотипизиране на лимфоцити в кръв за количествени цели изисква включване на комбинация от CD45 и CD14 антитела. Определянето на абсолютен брой може да се извърши директно, с помощта на стандартен материал – флуоресцентни частици с точно определен абсолютен брой или индиректно, като се използва друг метод за определяне на левкоцитния брой и ДКК (хематологичен брояч). Анализът обхваща оптимално 2000-5000 лимфоцита в електронния прозорец. Необходима апаратура – флоуцитометър с валидиран клиничен софтуер (опция), електронна пипета (опция), хематологичен брояч и/или светлинен микроскоп.

20. Количествено определяне на антиген-специфични CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцити

Описание: Процентното съдържание и абсолютен брой на антиген-специфични CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-лимфоцити може да се определи по вътреклетъчната експерсия на цитокини (IFN- γ или други) в отговор на стимулация с подходящ антиген.

Показания: вродени грешки на имунитета и вторични имунни дефицити, хронични инфекции, изследване на поствакцинален отговор и други специфични случаи, контрол на имуномодулираща терапия при трансплантирани пациенти.

Методи за изследване. Многопараметърната флоуцитометрия с комбинация от моноклонални антитела за едновременно анализ на вътреклетъчно експресирани цитокини и повърхностни антигени. Комбинациите за маркиране включват: антицитокинови моноклонални антитела (интерферон- γ , TNF- α и други) за установяване коекспресията на повърхностни активационни маркери (напр. CD69) и поне две антитела за определяне вида на лимфоцитната субпопулация (напр. CD3/CD4, CD3/CD8). При използване на размразени мононуклеарни клетки е препоръчително включването на маркер за виталност. Изследването включва задължителни контроли: маркирана нестимулирана проба и стимулирана проба, маркирана с изотипна контрола вместо антицитокиново моноклонално антитяло. Анализът на антиген-специфичен отговор включва 50 000 CD4 (CD8) Т-лимфоцита или не по-малко от 100 000 CD45-положителни събития във всяка епруветка. Допустимо е маркирането само с подходяща комбинация от активационни маркери, напр. CD69+CD154 за CD4 и CD69+CD137 за CD8 Т-лимфоцити, с уговорката, че този метод не дава информация за функционалността на идентифицираните антиген-специфични клетки. Алтернативен метод е маркирането с тетрамер (комплекс от синтетични HLA молекули и пептиден антиген). Този метод е скъп и силно ограничен от наличните реагенти и HLA хаплогена на пациента.

Активацията се извършва по валидирана методика, обикновено за срок от 8-20 ч на 37 °C, 5% CO₂ с антиген-специфични пептиди, според целта на изследването при спазване на общоприетите изисквания за стерилност. При стимулиране с антиген-специфични пептиди се добавят подходящи костимулатори (напр. анти-CD28 или CD28+CD49d моноклонални антитела). При същите условия задължително се включват неактивирана контрола (проба, несъдържаща антиген-специфичните пептиди) и проба, стимулирана с неспецифичен активатор (фитохемаглутинин, PMA/йониомицин, анти-CD3 антитяло). Когато се търси вътреклетъчна експерсия на цитокини, след първите два часа се добавя инхибитор на цитоплазмения транспорт (Brefeldin) или апарата на Голджи (Monensin), които блокират цитокиновата секреция.

21. Определяне на фагоцитоза и оксидативен взрив

Лабораторията по клинична имунология трябва да може да определя фагоцитоза и оксидативен взрив чрез утвърдени *методи*:

- микроскопска и/или флоуцитометрична оценка на процеса на поглъщане;

- микроскопски (процент на неутрофилни гранулоцити от периферна кръв, които са погълнали багрилото нитроблутетразол и са го редуцирали в цитоплазмата до тъмносини формазанови кристали);
- спектрофотометрично (количеството на екстрахирания формазан, погълнат по време на фагоцитозата);
- флуоцитометрично (дихидрородамин DHR-123 като флуорохромен субстрат с отчитане флуоресценцията на образувания родамин).

Показания: хронична хрануломатозна болест.

22. Флуоцитометрично имунофенотипизиране на хематологични заболявания

Описание: Лабораторията по клинична имунология, която осъществява имунофенотипизация на хематологични заболявания трябва да е в състояние, прилагайки адекватни маркери, панели и критерии за анализ, да диагностицира и субкласифицира левкемии и/или лимфоидни неоплазии, и/или плазмоклетъчни неоплазии, и/или пароксизмална нощна хемоглобинурия, и/или миелодиспластични синдроми и реактивни/регенераторни състояния на хемопоезата; идентифицира и определя количествено минимална резидуална болест; изследва повърхностни и/или интрацитоплазматични антигени в еритроцити, и/или тромбоцити; определя биологично активни молекули в клетъчни лизати и/или серум; количествено определя брой резидуални левкоцити в обезлеукоцитени кръвни продукти.

Използват се панели, които съдържат утвърдени основни и допълнителни маркери, които да позволяват определяне на линейна принадлежност, стадий на матурационен арест и наличие на аберантни фенотипи. Лабораторията по клинична имунология трябва да има възможности за морфологично и цитохимично изследване или добре функциониращ механизъм за комуникация със звена, осъществяващи морфологична оценка на същия клиничен материал. Всяко несъответствие между данните от морфологичното и имунофенотипното изследване следва да бъде изяснено.

Показания: диагноза и проследяване на хематологични заболявания – левкемии, лимфоми, плазмоклетъчни неоплазии, пароксизмална нощна хемоглобинурия и др.

Методи за изследване: Многопараметърна флуоцитометрия с минимум валидирана 3-цветна имунофлуоресценция (5-параметърна флуоцитометрия), с изключение на плазмоклетъчните неоплазии и контрол на минимална резидуална болест, за което е необходима не по-малко от 4-цветна. С използването на 8-10-параметърен анализ се увеличава възможността за идентифициране и характеризиране на абнормна популация в рамките на хетерогенната проба.

22.1. Флуоцитометрично имунофенотипизиране на левкемии

Описание: Лабораторията, която осъществява имунофенотипизация на левкемии, трябва да е в състояние, прилагайки адекватни маркери, панели и критерии за анализ, да разпознава: (i) бифенотипни и недиференцирани остри левкемии; (ii) остри лимфобластни левкемии (ОЛЛ) – В- и Т-клетъчни, както следва: про-В (В-I), common-В (В-II), пре-В (В-III) и зряла (В-IV) В-ОЛЛ, про-Т (Т-I), пре-Т (Т-II), кортикални Т (Т-III) и медуларни Т (Т-IV) Т-ОЛЛ; (iii) остри миелоидни левкемии (ОМЛ), както следва: ОМЛ с гранулоцитна и моноцитна диференциация, ОМЛ с минимална диференциация, остра промиелоцитна левкемия, еритролевкемия, мегакариобластна левкемия, бластни неоплазии от прекурсори на дендритни клетки.

Показания: остри левкемии, бластна криза/трансформация на хронична миелоидна левкемия или миелопролиферативна неоплазия или миелодиспластичен синдром.

Методи за изследване: Многопараметърна флуоцитометрия с валидирана минимум 4-цветна имунофлуоресценция.

22.2. Флуоцитометрично имунофенотипизиране на левкемизирали зрялоклетъчни лимфоидни неоплазии (лимфоми)

Описание: Лабораторията, която осъществява имунофенотипизация на зрели лимфоидни неоплазии (лимфоми), трябва да е в състояние да диагностицира хронична лимфоцитна левкемия (ХЛЛ); трихольв-

кемия; синдром на Сезари; да дава становище във връзка с установена лимфоцитоза, лимфаденомегалия и/или спленомегалия или характерни кожни изяви относно други В-клетъчни лимфоми (бъркитов, фоликуларен, мантиелноклетъчен, маргиналнозонов лимфом и др.); други Т-клетъчни лимфопролиферативни процеси; пролиферации на големи гранулирани лимфоцити (LGL) или NK (natural killer) клетки.

Показания: лимфоцитоза, спленомегалия, атипични лимфоидни клетки в периферна кръв.

Методи за изследване: Многопараметърна флоуцитометрия с валидирана минимум 4-цветна имунофлуоресценция.

22.3. Флоуцитометрично имунофенотипизиране на плазмоклетъчни неоплазии

Описание: Лабораторията, която осъществява имунофенотипизация на плазмоклетъчни неоплазии, трябва да е в състояние да идентифицира флоуцитометрично плазмочитна популация; да отграничава флоуцитометрично нормални от абнормни плазмочити; да определя клоналност на плазмоклетъчната популация на базата на цитоплазмена експресия на леки имуноглобулинови вериги чрез флоуцитометрично изследване.

Показания: плазмоклетъчни неоплазии.

Методи за изследване: Многопараметърна флоуцитометрия с валидирана минимум 4-цветна имунофлуоресценция.

22.4. Флоуцитометрично имунофенотипизиране за установяване на минимална (измерима) резидуална болест

Описание: Лабораторията, която осъществява имунофенотипизация за измерване на минималната (измерима) резидуална болест в хода на лечението на злокачествени хематологични заболявания (левкемии, левкемизирани лимфоми, плазмоклетъчни неоплазии), както и при проследяване по време на пълна ремисия, базира оценката на флоуцитометрично идентифициране на свързания с конкретната неоплазия антигенен профил на левкемичната популация; флоуцитометрично отграничаване на нормални от абнормни клетъчни популации, принадлежащи към неопластичната клетъчната линия; разработена стандартна процедура за обработка за предотвратяване загубата на клетки.

Показания: контрол на остатъчна болест при пациенти със злокачествени хематологични заболявания, преминали лечение с потенциал за промяна на биологичния ход на заболяването (химиотерапия, таргетна терапия, трансплантация, имунотерапия).

Методи за изследване: Многопараметърна флоуцитометрия с валидирана минимум 4-цветна имунофлуоресценция, препоръчително ≥ 6 -цветна.

22.5. Флоуцитометрично определяне на дефицит на повърхностни гликозилфосфатидилинозитол-свързващи молекули при пароксизмална нощна хемоглобинурия

Описание: Определяне на повърхностни гликозилфосфатидилинозитол свързващи молекули, в т.ч. CD55, CD59 и CD14, върху еритроцитна, гранулоцитна и моноцитна популация клетки от периферна кръв чрез флоуцитометрия може да се осъществи в имунологична лаборатория за установяване на клетъчни клонове с дефицит на тези молекули в диагностиката на пароксизмална нощна хемоглобинурия, апластични анемии, миелодиспластични синдроми.

Показания: пароксизмална нощна хемоглобинурия, апластични анемии, миелодиспластични синдроми.

Методи: Многопараметърна флоуцитометрия с валидирана минимум 4-цветна имунофлуоресценция.

23. Флоуцитометрично определяне на броя CD34⁺ хемопоеични стволови клетки

Определяне на броя CD34⁺ хемопоеични стволови клетки в периферна кръв, костен мозък, аферезен продукт за целите на трансплантация на хемопоеични стволови клетки или кръв от пълна връв се осъществява в имунологична лаборатория.

Показания: автоложна или алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки, ПИД.

Методи за изследване: имунофенотипизация чрез флоуцитометрия.

24. Определяне на химеризъм след трансплантация на хемопоеични стволови клетки

Описание: С термина „химеризъм“ след трансплантация на хемопоеични стволови клетки се означава съотношението на клетки на донора и реципиента, което се изследва на две седмици до 2-рия месец, на 3-тия месец и след това на тримесечни интервали до 18-ия месец. В зависимост от кондициониращия режим, клиничното състояние на пациента и резултатите от химеризма се извършват и междинни изследвания.

Показания: алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки, ПИД.

Методи за изследване: полимеразна верижна реакция (PCR), капилярна електрофореза, digital droplet-PCR и др.

25. Флоуцитометрично изследване на клетъчен цикъл и/или количество ДНК

Флоуцитометрично изследване на клетъчен цикъл и клетъчна ДНК чрез маркиране с ДНК специфични багрила, които се свързват в стехиометрично съотношение с ДНК молекулата, се осъществява в имунологична лаборатория.

Показания: онкохематологични и други онкологични заболявания.

Методи за изследване: флоуцитометрия.

26. Определяне на HLA системата

Описание: Лабораторията по клинична имунология, извършваща определяне на HLA системата при подготовка на реципиенти и донори за трансплантация на тъкани, органи и клетки, трябва да бъде акредитирана от Европейската федерация по имуногенетика (EFI) и да отговаря на Медицинския стандарт за имунологична подготовка (диагностика) при трансплантация на органи, тъкани и клетки.

Показания: 1. Трансплантация на клетки, тъкани, органи. 2. Асоциация със заболявания: Автоимунни заболявания/свръхчувствителност към лекарства: HLA-B27 → анкилозиращ спондилит, HLA-DR3, DR4 → диабет тип 1, HLA-DR2 → нарколепсия, HLA-DQ2/DQ8 → Цьолиакия, HLA-B*57:01 → свръхчувствителност към абакавир, HLA-B*15:02 → синдром на Стивънс-Джонсън, индуциран от карбамазепин, HLA-A*31:01 → свръхчувствителност към карбамазепин (други популации). 3. Фармакогеномика: Прогнозиране на нежелани лекарствени реакции или ефикасност на лекарствата. 4. Популационна генетика и антропологични изследвания. 6. Разработване на ваксини и имунотерапия.

Методи на изследване: Лабораторията по клинична имунология, извършваща определяне на HLA антигени във връзка с болестна предиспозиция, трябва да прилага утвърдени методи като:

– серологични или генетични методи с възможност за определяне на HLA-A,-B, -DRB1, -DQB1 специфичностите, официално признати от СЗО; неразграничими комбинации при използване на серологично типизиране се разграничават чрез ДНК метод;

– ДНК методи – PCR-SSP; PCR-SSOP; секвениране (PCR-SBT), секвениране от следващо поколение (NGS). Трябва да се спазват общоприети принципи за извършване на ДНК анализ: да има критерии за разграничаване на положителните резултати; при невъзможност за разграничаване на специфичен от неспецифичен антиген се използва алтернативен метод за HLA типизиране (серологичен, ДНК).

27. Определяне на циркулиращи алоантитела

Описание: Лабораторията по клинична имунология трябва да може да определя наличието на алоантитела и специфичността на HLA антигените, срещу които са насочени. Необходимо е да бъдат разграничени антителата срещу HLA антигени от антитела с друга специфичност.

Показания: трансплантация на клетки, тъкани, органи, репродуктивни неуспехи.

Методи за изследване: флоуцитометрия и др. утвърдени техники.

28. Кросмач реакция

Описание: Лабораторията по клинична имунология трябва да може да определя Т- и В-клетъчен кросмач; да има установен собствен праг за позитивен кросмач и изработени критерии за разграничаване на позитивните от негативните реакции; трябва да диференцира положителен кросмач, дължащ се на алоантитела, от този, дължащ се на автоантитела. Кросмач реакцията се извършва проспективно. Извършването на кросмач реакция при трансплантация трябва да съответства на Медицински стандарт за имунологична подготовка при трансплантация на органи, тъкани и клетки.

Показания: трансплантация на клетки, тъкани, органи, репродуктивни неуспехи.

Методи за изследване: с доказана висока чувствителност като флоуцитометрия.

29. Имуноцитохимично и имунохистохимично изследване на интрануклеарни/цитоплазмени/мебранны антигени и/или генетични последователности

Описание: Идентифициране и локализиране на интрануклеарни/цитоплазмени/мебранны антигени и/или генетични последователности в цитологични препарати от клетъчни суспензии и клетъчни линии или в тъканни срези чрез съответно имуноцитохимично/имунохистохимично или хибридизационно маркиране и последваща визуализация посредством флуоресцентни бои или ензимни системи за целите на диагностиката може да се осъществява в имунологична лаборатория. Целта е отграничаване на реактивни от неопластични процеси, определяне на клоналност, линия на диференциация и степен на съзряване, идентифициране на клетъчни субтипове, туморни маркери, фактори на средата, пролиферативна активност, имуноглобулини и леки вериги и др.

Показания: онкохематологични и онкологични заболявания.

Методи за изследване: микроскопска имуноцитохимия и имунохистохимия.

30. Определяне на инфекциозни повърхностни антигени или антитела и ДНК/РНК последователности в кръвен серум или плазма

Лабораторията по клинична имунология трябва да използва утвърдени методи за определяне на наличието и количеството на съответните антигени/антитела: имуноензимни или други сходни методи (MEIA микрочастици, имунохемилюминисценция, ензимносвързана флуоресценция).

Полимеразна верижна реакция (PCR): За изходен материал се използва вирусна нуклеинова киселина, екстрахирана от биологични течности, тъкани и клетки. Доказване и идентификация на вирусни геноми чрез определяне на наличие (качествено) или концентрация (количествено) на вирусни геноми в биологични течности или тъкани.

Показания: инфекциозни заболявания, ПИД, ВИД, състояния след органна или КМТ, генотипова/субгенотипова идентификация, както и за оценка на ефекта при прилагане на антивирусни терапии.

Методи за изследване: микроскопска имуноцитохимия, имунохистохимия или хибридизация, качествена и количествена PCR реакция.

31. Изследване на клонални пренареждания на гените на тежки имуноглобулинови вериги (IgH) и Т-клетъчни рецептори (TCR)

Описание: Изследване на клонални пренареждания на гените на тежки имуноглобулинови вериги (IgH) и Т-клетъчни рецептори (TCR) може да се осъществява в имунологична лаборатория. По този начин се предоставят молекулярни доказателства за клоналност при суспектни лимфопролиферативни нарушения и отграничаване от поликлонални реактивни състояния, установява се евентуална клонална връзка между процеси с различна локализация и/или между проба към диагноза и при рецидив, прилага се за изследване на минимална (измерима) резидуална болест при злокачествени лимфопролиферативни заболявания.

Показания: лимфоцитоза, онкохематологични заболявания.

Методи за изследване: капилярна електрофореза, полимеразна верижна реакция в реално време, Sanger секвениране, секвениране от ново поколение.

32. Изследване на TREC (кръгове за ексцизия на Т-клетъчни рецептори) и KREC (кръгове за ексцизия на капа-делетираща рекомбинация)

Описание: TREC са малки, кръгови ДНК фрагменти, образувани по време на пренареждане на гена на Т-клетъчния рецептор в тимуса. Използват се като маркер за производство на нови Т-клетки (наивни Т-клетки). KREC са ДНК кръгове, образувани по време на пренареждане на В-клетъчния рецептор в костния мозък. Използват се като маркер за производство на нови В-клетки (наивни В-клетки).

Показания: Основно приложение: Скрининг на новородени за вродени грешки на имунитета, особено: ТКИД (тежък комбиниран имунодефицит) → ниски/липса на TREC. Агамаглобулинемия → ниски/липса на KREC. Разширени приложения: Ранно откриване на: Т-клетъчна лимфопения (напр. синдром на Ди Джордж), В-клетъчни дефекти, мониторинг след трансплантация на костен мозък или стволови клетки, проследяване на имунното възстановяване след терапия.

Методи за изследване: Вземане на проба: Суха кръвна проба (DBS) от убождане на петата — стандарт при скрининг на новородени. Геномна ДНК се изолира от кръвната проба.

PCR базирани технологии, вкл. автоматични платформи.

33. Изследване на цитокини в плазма, серум, ликвор и др. биологични течности

Описание: Цитокините са малки сигнални протеини, секретирани предимно от имунни клетки, играещи ключова роля в имунитета, възпалението и хематопоезата. Тяхното откриване и количествено определяне са жизненоважни за разбирането на имунните отговори, диагностицирането на заболявания и наблюдението на ефикасността на лечението.

Показания: А. Имунологични и възпалителни заболявания: Ревматоиден артрит, лупус, IBD: Профилирането на цитокини помага при диагностициране, оценка на обостряния и мониторинг на терапията (напр. TNF- α , IL-6). Астма и алергии: Цитокини като IL-4, IL-5 и IL-13 са ключови при възпаление от тип Th2.

Б. Инфекциозни заболявания: COVID-19, HIV, сепсис: Мониториране на цитокинови бури или имunosупресия (напр. IL-6, IFN- γ). Туберкулоза: Тестове за освобождаване на IFN- γ (IGRA), използвани за диагностика на латентна туберкулоза.

В. Онкология: Мониторинг на имунотерапията на рака: Цитокини като IL-2, IFN- γ и IL-10 са индикатори за имунно активиране или супресия. Откриване на биомаркери: Прогноза и прогнозиране на терапевтичния отговор.

Г. Трансплантация: Мониториране на нивата на цитокини за откриване на отхвърляне на присадката или инфекция след трансплантация.

Д. Вродени грешки на имунитета, в т.ч. автовъзпалителни синдроми – диагностика и мониториране на терапевтичен отговор.

Методи за изследване: Имуноензимни методи (ELISA, мултиплексни имуноанализи, напр. Luminex, уестърн блот, имунохистохимия); молекулярни техники (qPCR, RT-PCR RNA-seq); клетъчно-базирани техники (флоуцитометрия – вътреклетъчно оцветяване, ELISpot).

III. ПРАВИЛА ЗА ДОБРА МЕДИЦИНСКА ПРАКТИКА ПРИ НЯКОИ ИМУНОМЕДИИРАНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

1. Правила за добра медицинска практика за диагностика и лечение на вродени грешки на имунитета (IEI)

Целта на Правилата за добра медицинска практика за диагностика и лечение на вродени грешки на имунитета е да предостави практически и консултантски насоки на клинични имунолози и други практикуващи лекари за клинично разпознаване и диагностика на вродени имунодефицити, както и да представи общи принципи на тяхното лечение и проследяване. По отношение на терминологията се използва и понятието първичен имуен дефицит (ПИД).

По същество ПИД са наследствени заболявания на имунната система. Засегнатите лица са разположени в голяма степен към развитие на тежки инфекции, имунна дисрегулация с автоимунно заболяване и аберантна възпалителна активност, както и злокачествени заболявания. ПИД се срещат средно при 1:2000 живи раждания, поради което повечето от тях се причисляват към групата на редките заболявания. Описани са над 559 генетични нарушения, водещи до дисфункция на имунната система. Според класификацията на IUIS 2024 г. (International Union of Immunological Societies) вродените грешки на имунитета (IEIs) са обособени в десет големи групи: (1) имунодефицити, засягащи клетъчния и хуморалния имунитет, (2) комбинирани имунодефицити със синдромни характеристики, (3) предимно антителни дефицити, (4) заболявания на имунната дисрегулация, (5) вродени дефекти на фагоцитния брой и функция, (6) автовъзпалителни заболявания, (7) комплементни дефицити, (8) костномозъчни дефекти, (9) фенотипия на ПИД, асоциирани с автоантитела или соматични варианти. Най-често ПИД се категоризират според комбинацията на нарушените механизми на имунния отговор и клиничните характеристики. Диагнозата на някои от най-честите синдроми се базира на диагностичните критерии на ESID (European Society for Immunodeficiency) и PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency).

Правилата за добра медицинска практика при пациенти с редки заболявания – ПИД, са разработени въз основа на: международните консенсуси за диагностика, лечение и проследяване на тази група пациенти; гайдлайна на американската фондация за ПИД (Immune Deficiency Foundation); опита и алгоритмите на Експертния център по редки заболявания – ПИД, УМБАЛ „Александровска“, София, и други източници. Представени са по основни класификационни групи и съдържат раздели „Диагноза“, „Мениджмънт и дългосрочно наблюдение“, „Генетична консултация“.

A. КЛЕТЪЧНИ ИЛИ КОМБИНИРАНИ ИМУННИ ДЕФИЦИТИ

Систематизирането на клетъчните дефекти в зависимост от МКБ-10 е представено на таблица 2.

Диагноза

Диагностичният алгоритъм за поставяне на диагнозата клетъчен или комбиниран имуен дефицит е представен на фиг. 1.

Засегнатите индивиди обичайно са с понижен Т-лимфоцитен брой и нарушена Т-клетъчна функция, което може да доведе и до проблеми с производството на антитела. Тези индивиди имат както честоти, така и необичайни инфекции. Обикновено се проявяват при новородени или малки деца с неблагоприятна до фатална прогноза без ранна диагноза и медицинска намеса. Не всички засегнати индивиди имат малформативни промени или типични клинични белези, като тези с тежък или пълен синдром на DiGeorge или някои със синдрома на Wiskott-Aldrich. Повечето кърмачета с тежки Т-клетъчни дефекти нямат характерни външни признаци, които да ги различават от другите деца в тази възраст. Основен признак на ПИД са тежките и трудно повлияващите се на лечение инфекции. Най-тежките форми на клетъчни или комбинирани дефекти представляват спешно състояние и трябва бързо да се консултират

с имунолог, за да се планира лечението, вкл. трансплантация на хемопоеични стволови клетки (ТХСК) за постигане на имунна реконституция. Ранната диагноза може да предотврати инфекциите и е животоспасяваща. За ранно откриване на ТКИД се използват молекулярни технологии за детекция на ТРЕК/КРЕК, които се прилагат върху суха капка кръв в рамките на неонатални скринингови програми.

Таблица 2. Клетъчни или комбинирани имунодефицити

Заболяване	Наименование	Описание по МКБ-10	МКБ 10 код
Тежък комбиниран имунен дефицит (ТКИД)	Синдрома „Балонено момче“, Заболяването на „Момчето от стерилната стая“, ТКИД	Тежък комбиниран имунодефицит с ретикуларна дисгенеза	D81.0
		Тежък комбиниран имунодефицит с ниско съдържание на Т- и В-клетки	D81.1
		Тежък комбиниран имунодефицит с ниско или нормално съдържание на В-клетки	D81.2
		Дефицит на аденозиндезаминаза (ADA)	D81.3
		Синдром на Nezelof	D81.4
		Дефицит на пурин-нуклеозид фосфорилаза (PNP)	D81.5
		Дефицит на главния хистокompatибил комплекс клас I	D81.6
		Дефицит на главния хистокompatибил комплекс клас II	D81.7
		Други комбинирани имунодефицити	D81.8
		Комбиниран имунодефицит, неуточнен	D81.9
Синдром на Wiskott-Aldrich	WAS	Синдром на Wiskott-Aldrich	D82.0
Синдром на Di George, още познат като 22q11 делеционен синдром	Тимусна аплазия	Синдром на DiGeorge	D82.1
Атаксия-телеангиектазия	А-Т	Малкоможъчна атаксия с дефекти във възстановяването на ДНК	G11.3
		Други наследствени атаксии	G11.8

Пациентите с клетъчни или комбинирани имунни дефекти имат следните характеристики:

- изглеждат болни
- понякога имат дисморфично лице – напр. синдром на DiGeorge, ектодермална дисплазия (NEMO), хипер-IgE-синдром
- изостават в развитието си (теглото е по-информативно от ръста)
- имат вродено сърдечно заболяване, напр. сърдечен шум при раждане, цианоза при синдром на DiGeorge
- имат промени в кожата
 - тежък обрив от памперс или орална кандидоза
 - екзема – при синдрома на Wiskott-Aldrich
 - еритематозен обрив – синдром на Omenn или атипичен пълен синдром на DiGeorge
 - телеангиектазии – при ataxia-telangiectasia (AT)
 - петехии – при синдром на Wiskott-Aldrich
 - кожни вирусни инфекции
 - тънка коса, липса на нокти или намалено изпотяване (NEMO)
- хронична рефрактерна на лечение диария
- развитие на тежки вирусни инфекции, причинени от респираторен синцитиален вирус (RSV), цитомегаловирус (CMV), вируса на Епщайн-Бар (EBV) или аденовирус
 - развият инфекция, която не е придружена от лимфаденопатия, с изключение на синдрома на Wiskott-Aldrich
 - проява на нежелани реакции след прилагане на живи ваксини

- неврологични находки – атаксия (АТ) или тетания на новороденото (синдром на DiGeorge)
- необходимо е да се изключи инфекция с HIV чрез директно вирусно тестване (вирусно натоварване, PCR), а не само тестове за антитела.

Някои комбинирани дефекти, макар и фатални без лечение, първоначално не са толкова тежко проявени. Примери за това са зета-свързан протеин (ZAP) 70 дефицит, пурин-нуклеозид фосфорилазен дефицит (ADA), синдром на Wiskott-Aldrich, МНС клас II дефицит или дефицит на модулятора на ядрения фактор-капа В (NEMO). Клиничното разпознаване на атаксия-телеангиектазия може също да се забави, тъй като признаците се развиват прогресивно през първите няколко години от живота.

При подозрение за ТКИД кърмачето трябва да се изолира от други малки деца и такива с инфекции и незабавно да се насочи за консултация с имунолог за преценка на лечението, тъй като това е спешно състояние в педиатрията.

Лабораторни и имунологични изследвания

Необходимо е изследване на броя на белите кръвни клетки с диференциално броене (по възможност мануално), за да се определи дали пациентът има нисък абсолютен брой на лимфоцитите (т.е. лимфопения). Трябва да се вземат предвид референтните стойности за съответната възраст. Лимфопения има при:

- деца под 3 месеца $< 3,4 \times 10^9/L$;
- 4-6 месеца $< 3,9 \times 10^9/L$;
- 7-24 месеца $< 3,4 \times 10^9/L$;
- 3-6 години $< 2,3 \times 10^9/L$;
- 7-12 години $< 1,9 \times 10^9/L$;
- 13-18 години $< 1,4 \times 10^9/L$;
- възрастен $< 1,0 \times 10^9/L$.

Броят на тромбоцитите и данните за размера им също могат да бъдат полезни, за да се изключи синдром на Wiskott-Aldrich.

Други основни диагностични тестове са: имунофенотипизиране на левкоцити от периферна венозна кръв или друг източник с основни и/или разширени панели моноклонални антитела, включително определяне на паметови/наивни субпопулации, В-клетъчни субпопулации, оценяващи степента на класово превключване, експресия на активационни маркери, Treg, Th17 профилиране, определяне експресия на рецептори, свързани с дадени дефекти, вътреклетъчно определяне на протеини и сигнални пътища, оценка на клетъчна активация и пролиферация.

Оценката на хуморалния имунен отговор включва възможности за определяне на всички видове имуноглобулини и имуноглобулинови субкласове, оценка на антителен отговор срещу различни панели ваксинални антигени, изследване на цитокини и адхезионни молекули.

От молекулярните тестове от основно значение са генетичните и имуногенетичните изследвания, изследване на химеризъм и др.

Неонатален скрининг за Т-клетъчна лимфопения: Неонаталният скрининг за тежък комбиниран имунен дефицит (ТКИД) и повечето други Т-клетъчни нарушения се извършва рутинно в над 25 щата на САЩ и в редица европейски страни. У нас се направи пилотно проучване с оглед внедряването в рутинната практика. Този скрининг позволява ранна диагноза на сериозни имунни дефекти, много от които изискват лечение с ТХСК. Тестът използва изсушена кръвна капка на филтърна бланка, от която се извлича ДНК за анализ на Т-клетъчен рецептор посредством ТРЕК – Т-клетъчно рецепторни остатъчни кръгове. Ниските стойности на ТРЕК е необходимо да бъдат потвърдени, да се проведе незабавна консултация от експерт клиничен имунолог, както и допълнителни имунологични и генетични изследвания в насока ПИД, за да се постави навременна диагноза и да се оцени нуждата от ТХСКТ.

Мениджмънт и дългосрочно наблюдение

1. При фамилна анамнеза за смърт в най-ранна детска възраст поради инфекция трябва да се направи основен и достъпен скринингов тест – общ брой на левкоцитите с мануално диференциално броене (напр. от кръв от пъпната връв), който ще помогне за диагностициране или изключване в повечето случаи на

ТКИД при последващо раждане. При намаление на левкоцитите трябва да се направи флоуцитометричен анализ на Т-клетъчните субпопулации. Ако Т-клетките са понижени, е необходимо да се оцени тяхната функция. При наличие на Т-клетки, трябва да се има предвид, че те може да са преминали трансплацентарно от майката или кърмачето може да има клонални клетки, както при синдрома на Omenn или други форми на „пропускливи ТКИД“. И в двата случая функцията на Т-клетките ще бъде намалена.

2. Типичните сериозни, често фатални инфекции при пациенти с ТКИД се дължат на RJP (пневмоцистна пневмония), Candida, RSV, вирус параинфлуенца 3, CMV, EBV и/или аденовирус. Ако се подозира, че новороденото има ТКИД, то трябва да се постави на профилактика за RJP с триметоприм/сулфаметоксазол.

3. Кърмачета с ТКИД и други сериозни дефицити на Т-клетки не трябва да получават живи вирусни ваксини (напр. срещу варицела, морбили, паротит, рубеола, херпес зостер, ротавирус, жълта треска, едра шарка, жива атenuирана грипна ваксина или жива бактериална ваксина (БЦЖ или коремен тиф)).

4. Напълно убити ваксини могат да бъдат от полза при деца с частична Т-клетъчна функция. Индивидите в непосредствен контакт с пациентите с имунодефицит (напр. членове на семейството) не трябва да получават живи ваксини, но се насърчава категорично периодичното им ваксиниране с убити ваксини.

5. За тези с ТКИД и други пациенти с Т-клетъчен дефицит, които са трансплантирани, но не са възстановили пълна имунна компетентност, или които получават имunosупресивни лекарства (т. е. профилактика на реакция на присадката срещу гостоприемника), се прилагат същите правила за избягване на живи ваксини.

6. За пациенти с имунодефицит, чийто имунитет е напълно възстановен, на родителите и пациентите трябва да се предостави информация за риска спрямо ползата от всяко приложение на жива ваксина от опитни клинични имунолози след подходящи изследвания за оценка на имунния отговор. Пациенти с частични Т-клетъчни дефицити, като частичен DiGeorge синдром, които неволно са получили живи ваксини срещу морбили, паротит и рубеола без последствия, също трябва да избягват други живи ваксини. Клиничната преценка и определянето на компетентността на Т-клетките, оценени от Т-клетъчен отговор към митогени и антигени, трябва да бъдат фактори за вземане на решение дали живите ваксини са безопасни.

7. Когато деца с клетъчен имуноен дефицит са имуновъзстановени (напр. след ТХСК), те могат да получат отслабени живи вирусни ваксини (напр. срещу морбили, паротит, рубеола и евентуално варицела). Консултацията с имунолог е от съществено значение. Внимателната преценка за поставяне на живи отслабени вирусни ваксини се отнася и за деца с по-малко тежък клетъчен имуноен дефицит като частичен DiGeorge синдром.

8. Възстановяването на имунната система при пациенти с ТКИД обикновено изисква трансплантация на хемопоеични стволови клетки в началото на живота. Предтрансплантационната химиотерапия не е необходима за кърмачетата с ТКИД, тъй като те нямат Т-клетки. Генната терапия е изпробвана със значителен успех, но има сериозни нежелани реакции. Пациентите с ТКИД, които са получили успешна ТХСК, изискват поне едногодишно проследяване от имунолог в специализиран център.

9. Само облъчени (5000 RAD), CMV отрицателни, делевоцитни кръвни продукти трябва да се използват за пациента с ТКИД или други предполагаеми дефекти на Т-клетки.

10. Пациенти с комбинирани имунодефицити (КИД) може да имат ниска, но не отсъстваща Т-клетъчна функция и невъзможност за продукция на специфични антитела въпреки нормалните или повишени нива на имуноглобулини. Те изискват заместителна терапия с имуноглобулини. Например, въпреки че пациентите с Wiskott-Aldrich синдром могат да имат нормални серумни нива на имуноглобулини, те обикновено се лекуват с имуноглобулинов заместител, защото способността им да синтезират антитела е нарушена. При пълната форма на синдрома на DiGeorge с $< 2\%$ Т-лимфоцити препоръчителната терапия е трансплантацията на тимус.

11. Дългосрочните прогнози за частичен синдром на DiGeorge обикновено са задоволителни от имунологична перспектива. Въпреки това рискът от други усложнения, като забавяне на развитието, гърчове, тежко автоимунно заболяване или индуциран от EBV лимфом, остава. Пациентите с Ataxia telangiectasia и пациентите с ТКИД, вследствие на мутация в гените на Artemis и лигаза 4, трябва да сведат до минимум излагането на йонизиращото облъчване, тъй като имат повишен риск от хромозомни счупвания и съответните им усложнения.

Молекулярна диагностика и имунологична консултация

За много от клетъчните или комбинирани имунни дефицити е известен генетичният дефект. Някои от тях се унаследяват Х-свързано; много други следват автозомно-рецесивно унаследяване. Специално внимание за генетичното консултиране на семейства, засегнати от тези заболявания, заслужава фактът, че има няколко различни гена, които, когато мутират, водят до същото клинично проявление. Например известно е, че мутациите в един от поне тринадесет гена могат да причинят ТКИД. Най-честата форма на ТКИД е Х-свързана; всички други форми са с автозомно-рецесивно унаследяване. Затова от решаващо значение е да се направи генетично изследване, за да се определи специфичният ген, участващ в тези нарушения, и да се предоставят точни оценки на рисковете за засегнатите членове на семейството. Въпреки това генетичното изследване не трябва да забавя започването на подходящо лечение на пациента. Генетичните тестове за много от клетъчните или комбинирани имунодефицитни заболявания са налични в специализирани лаборатории у нас и в чужбина.

Синдромът на DiGeorge е първичен имунодефицит, който се унаследява автозомно-доминантно, но повечето случаи са спорадични. Той е причинен от делеция на част от област на хромозома 22 в повече от половината случаи, от мутации в ген на хромозома 10 при 10%, при останалите – причината е неизвестна. Засегнати са и двата пола. Тъй като много от тези случаи се появяват като нови мутации в гените на хромозома 22, е важно да се направи молекулярно тестване на родителите на дете с това заболяване поради възможна клинична вариабилност и евентуални клинични или субклинични прояви при засегнатия родител. Рискът от рецидив на болестта в семейството се определя от това дали мутацията е унаследена, или е спонтанно възникнала. Генетичните тестове за делеционните синдроми са достъпни в специализирани лаборатории.

Фигура 1. Диагностичен алгоритъм при съмнение за клетъчен или комбиниран имуноен дефицит



В. ДЕФЕКТИ В СИНТЕЗА НА АНТИТЕЛА

Систематизирането на антителните дефекти в зависимост от МКБ-10 е представено на таблица 3.

Таблица 3. Антителни дефекти

Заболяване	Наименование	Описание по МКБ	МКБ 10 код
Х-свързана агамаглобулинемия (болест на Брутон)	Агамаглобулинемия XLA	Наследствена хипоагамаглобулинемия	D80.0
Общ вариабилен имунен дефицит (CVID)	Хипо- или агамаглобулинемия с късна изява (CVID)	Друг общ вариабилен имунен дефицит	D83.8
		Общ вариабилен имунен дефицит, неспецифициран	D83.9
Х-свързан или автозомен хипер-IgM синдром	Хипер-IgM	Имунен дефицит с повишен IgM	D80.5
Селективен IgA дефицит	IgA дефицит	Селективен дефицит на IgA	D80.2

Диагноза

Диагностичният алгоритъм при съмнение за антителен дефицит е представен на фигура 2.

Обикновено повтаряща се на едно и също място инфекция не е показателна за първичен имунен дефицит. От друга страна, рецидивиращи инфекции, засягащи различни органи и системи, могат да се свържат с наличие на ПИД. Тези инфекции и състояния включват:

- Рекурентни синопулмонални инфекции
- Пневмония с треска
- Синусити, обективизирани с рентгенологично или компютър-томографско изследване
- Среден отит (въпреки че чести отити се наблюдават и при здрави деца и съответно преценката трябва да бъде индивидуална и отделна при всеки случай). Рецидивиращи отити и след поставяне на ушни вентилационни тръбички насочват към ИД.

● Менингит и/или сепсис

● Гастроинтестинални инфекции, хронична диария или малабсорбция

● Кожни инфекции.

В допълнение, някои автоимунни и алергични прояви също могат да бъдат асоциирани с някои ПИД, вкл. и с антителните дефицити. Примери за автоимунни прояви, като изява на ПИД, са цитопениите (автоимунна хемолитична анемия, неутропения, тромбоцитопения), ревматични прояви и ендокринни нарушения. Развитие на автоимунитет при пациенти с антителен дефицит може да се наблюдава при болни с IgA дефицит и общ вариабилен имунен дефицит (Common Variable Immune Deficiency – CVID). Алергични прояви с повишаване на серумното ниво на IgE могат да се наблюдават при пациенти с IgA дефицит.

Промени от физикалния преглед, насочващи към антителен дефицит:

- Липсващи или малки по размер тонзили и периферни лимфни възли при пациенти с Х-свързана и автозомно-рецесивна агамаглобулинемия и при пациенти с Х-свързан хипер-IgM синдром.

- Лимфаденомегалия и спленомегалия при пациенти с CVID и автозомно-рецесивен хипер-IgM синдром

- Перфорации и белези на тъпанчевата мембрана
- Белодробна находка – хрипове и „свиркания“
- Барабани пръсти.

Лабораторни и имунологични изследвания

- Пълна кръвна картина (ПКК) с диференциално броене (ДКК) – в някои случаи мануално.

Тестът е с голямо клинично значение, защото дава възможност да се оцени дали лимфоцитите, неутрофилите и тромбоцитният брой и размер са нормални. Чрез оценка на ПКК могат да бъдат изключени множество ИД. При съмнение за ПИД е препоръчително извършване на мануално ДКК.

- Измерване серумното ниво на IgG, IgA, IgM, IgE.

Получените резултати трябва да се интерпретират в контекста на възрастта и клиничната картина на изследвания пациент. Съществуват известни затруднения при интерпретация на серумното ниво на IgA, което може да бъде определено като ниво под детекционната граница за кита. Това води до невъзможност за разграничаване на много ниско ниво на IgA от липсващ серумен IgA. Хипергамаглобулинемия може да се наблюдава при HIV, хронична грануломатозна болест (CGD) и автоимунен лимфопролиферативен синдром (ALPS). Измереното серумно ниво на имуноглобулиновите класове трябва да се сравнява с установени за съответната популация възрастово обусловени референтни граници. В по-редки случаи се измерват IgG субкласовете.

Измерване на специфични към ваксини антитела (поствакцинален антителен отговор). Провеждането на тези тестове е от изключителна важност, за да се определи дали наистина съществува антителен дефицит, когато серумното имуноглобулиново ниво е нормално или леко понижено. Необходимо е изследване на поствакциналния отговор както срещу протеинови (тетаничен и дифтерийен токсин), така и срещу полизахаридни (пневмококови полизахариди) антигени. Пациентите могат да отговорят на тетаничен токсин поради присъствие на паметови В-лимфоцити вследствие на предходни ваксинации, но да не отговорят на пневмококови полизахариди след ваксинация с пневмококова ваксина (Pneumovax), което насочва към антителен ИД. Изохемаглутинините (антитела към кръвнотруповите антигени) са нативни антиполизахаридни антитела предимно от IgM клас. Липсата им при пациенти над 2-годишна възраст, които са с кръвна група, различна от АВ, също насочва към антитялов дефицит.

Когато тези скринингови тестове не са убедителни и клиничното подозрение за антителен дефицит е значително, пациентът трябва да бъде насочен към имунолог за по-нататъшна оценка преди започване на имуноглобулинова (Ig) заместителна терапия. Това важи особено за пациенти, които са били диагностицирани с IgG субкласов дефицит или с "полизахариден антителен дефицит". Тези диагнози често се основават на резултатите от измерванията на серумните IgG субкласове или тестовете на антипневмококовите антителни титри. Резултатите трябва да се интерпретират в контекста на клиничната картина и физикалния преглед. Много е важно всички гореизброени тестове да бъдат извършени, преди да се започне заместителна терапия. След започване на имуноглобулинова субституция извършването на тестове в насока хуморален ИД е трудно за интерпретация.

Оценката за наличие на дадена инфекция при пациенти, суспектни за антителен дефицит или с доказан такъв, както и при пациенти с клетъчен или комбиниран ИД, **не трябва да бъде чрез серологично изследване**, защото при тях поради невъзможността за антителна продукция може да даде фалшиво негативен серологичен резултат. В тези случаи е необходимо извършване на микробиологично изследване (посевка, антигенна детекция) или PCR базирано изследване. От друга страна, при пациентите на заместителна терапия може да има положителни антителни резултати срещу множество инфекциозни антигени поради присъствие на антитела срещу съответните антигени в имуноглобулиновите препарати, използвани за заместителна терапия (т.е. бихме имали фалшиво положителни резултати).

Мениджмънт и дългосрочно наблюдение

С изключение на селективния IgA дефицит и преходната хипогамаглобулинемия в детска възраст пациентите с диагностициран антителен дефицит се лекуват през целия си живот с **имунозаместителна терапия с редовни интравенозни (IV) или подкожни (SC) инфузии**. Имуноглобулиновите продукти за заместителна терапия се състоят от широк спектър IgG антитела, получени от донорска плазма на приблизително 10 000 здрави донори на партида. Полуживотът на тези IgG антитела е 19-21 дни или по-дълъг при имунодефицитни пациенти, като количествата на другите имуноглобулинови класове (IgA, IgM) са изключително ниски, така че те не допринасят за повишаване серумното ниво на тези протеини при пациента. Интервалът между инфузиите обикновено е 2-4 седмици при интравенозен начин на приложение и по-често (1 до 14 дни) при подкожно приложение, въпреки че сега има Ig препарати, които могат да се прилагат подкожно на всеки 3-4 седмици.

1. Необходимо е клиничен имунолог да определи дозата и интервала между инфузиите за всеки отделен пациент. Обичайно, месечната доза варира в диапазона от 400 до 600 mg/kg телесно тегло. "Trough" нивото на IgG (нивото преди предхождаща апликация) трябва да се оценява по-често при започване на терапията, а впоследствие след постигане на желано, стабилно ниво поне веднъж годишно с оглед оценка на промени в метаболизма при конкретния пациент. Пациентите на субкутанна заместителна терапия може да се нуждаят от по-често проследяване на нивото на серумния IgG, за да се оцени техният кърмплайнс.

2. Корекция в дозата е необходима по време на детството, свързано с нормалния растеж и развитие, както и по време на бременност, особено през третия триместър. При пациенти с много ниски изходни нива на IgG, прицелната стойност на IgG („trough“ нивото) трябва да бъде поне на долна или над долната референтна граница за възрастта. Дозата може да варира в зависимост от преценката на имунолога на база клиничното състояние на пациента. Проучванията показват, че когато "trough" нивото при възрастни пациенти с агамаглобулинемия се поддържа над 8 g/l, се предотвратяват сериозни бактериални заболявания и ентеровирусни менингоенцефалити. По-високи прицелни нива (> 8 g/l) може да са необходими за предотвратяване на белодробни компликации. Важно е да се осъзнае, че за почти всички потвърдени антителни дефицити е необходима доживотна Иг заместителна терапия.

3. Имунозаместителната терапия е тип превантивна терапия, така че, когато пациентът развие инфекция е необходимо провеждане на агресивно антибиотично лечение, съобразено с изолирания причинител. Важно е да се има предвид, че терапията с Иг замества само циркулиращия IgG и не замества секреторните имуноглобулини, така че лигавичните инфекции остават сериозен проблем. Част от пациентите с антителен дефицит, независимо от прилаганата в адекватни дози имунозаместителна терапия могат да развиват рекурентни и/или хронични бактериални синусити, белодробни и/или гастроинтестинални инфекции. В тези случаи е показана по-продължителна антибиотична профилактика. В случай на подобни усложнения са необходими активен мониторинг на синусите, оценка на белодробната функция чрез спирометрия и/или образно изследване и оценка на хроничната диария или малабсорбция с подходящи микробиологични тестове на фецес. Семействата могат да очакват, че ефективната заместителна терапия ще доведе до подобряване на посещаемостта в училище и/или работа от засегнатите им роднини.

4. Спирометрия е необходимо да се извършва ежегодно или на 6-месечни интервали при прогресираща белодробна патология. Оценка на белодробната функция с измерване на дифузионен капацитет трябва да се извършва ежегодно при пациенти със CVID, които имат интерстициална и/или грануломатозна белодробна болест. Кръвните изследвания, оценяващи чернодробната и бъбречната функция, трябва да бъдат проведени преди започване на заместителната и профилактична антибиотична терапия и най-малко веднъж годишно след това.

5. При наличието на неврологична симптоматика е необходимо провеждане на лумбална пункция за изследване на цереброспинална течност с оглед откриване на ентеровирусен менингоенцефалит, особено при пациенти с X-свързана агамаглобулинемия (болест на Bruton). Оценка на развитието на такива деца трябва да се прави ежегодно или на 6-месечни интервали, ако заболяването прогресира.

6. От прогностична гледна точка пациентите с антителен дефицит и наличие на В-лимфоцити (установени флуоцитометрично), напр. пациенти със CVID, са изложени на риск от развитие на аутоимунни прояви.

7. Грануломатозни кожни, чернодробни, спленални и белодробни лезии при пациенти със CVID могат да бъдат погрешно диагностицирани като саркоидоза. Грануломатозните усложнения по принцип влошават прогнозата за пациента.

8. Пациенти със CVID, X-свързана (Bruton's) агамаглобулинемия или X-свързан хипер IgM синдром могат да се представят с хронична диария и малабсорбция, дължащи се на инфекция с паразити,

като например *Giardia lamblia* или *Cryptosporidium*, или вследствие на тънкочревен бактериален свръх-растеж. *C. difficile* причинява инфекции на дебелото черво с диария и може да възникне при хоспитализирани индивиди или такива на антибиотична терапия.

Имуноглобулинова терапия при несигурна диагноза

1. При несигурна диагноза и започната вече имунозаместителна терапия трябва да се прецизира нейната необходимост. Това се отнася особено за пациенти, чийто серум показва наличие на IgA, IgM и IgE, несъдържащи се в сигнификантни количества в препаратите, използвани за лечение. В случай, че тези имуноглобулинови класове присъстват в серума на пациента, това означава, че той е способен да ги синтезира. От друга страна, измереното серумно ниво на IgG и антителният отговор към ваксинални антигени може да се дължат изцяло на тези, съдържащи се в препарата, използван за терапия.

2. За по-нататъшна оценка дали пациентът може да продуцира IgG, се използва анализ на постваксиналния отговор към неоантигени (към антигени от ваксини, които не се прилагат рутинно, например бактериофаг phi X174) и към които в имунозаместителните продукти не се съдържат антитела. анализът на антителния отговор след имунизация с бактериофага е ценен, защото може да се проведе, без да е необходимо прекъсване на заместителната терапия. Недостатък е, че изследването е възможно да бъде проведено само във високоспециализирани звена.

3. Като алтернативен подход, само след консултация с клиничен имунолог и под негово наблюдение, терапията може да бъде спряна през пролетта или лятото, когато рискът от развитие на инфекции е по-малък. Три месеца след спиране на терапията пациентът може да бъде реимунизиран с убита ваксина и след две до три седмици да бъде оценен съответният антителен титър. Ако нивата на серумните имуноглобулини и антителният титър към бактериофаг phi X174 и/или към ваксиналния антиген са в референтни граници, то тогава пациентът не се нуждае от заместителна терапия.

4. Кожни тестове към алергени също могат да бъдат използвани за установяване на алергия, но чрез тях по-трудно може да се прецени необходимостта от субституираща имуноглобулинова терапия.

Проследяване на имуноглобулиновата терапия при пациенти с антителен дефицит

1. Честота на изследване на серумен IgG за „trough“ ниво. Необходимо е изследване на серумното ниво на IgG поне веднъж годишно, точно преди последваща инфузия (по-често в случай на пациент с инфекции).

2. Необходимо е да се има предвид, че инфекции на гастроинтестиналния тракт (ГИТ) с *Giardia lamblia* или други причини за интестинално заболяване, като например IBD (inflammatory bowel disease) могат да доведат до загуба на IgG през ГИТ и това да доведе до неочаквано ниско серумно ниво на IgG. В случай на загуба през ГИТ се очаква и понижаване на серумния албумин. Обикновено след адаптиране на дозата с поддържане на добро „trough“ ниво и при липса на загуба през ГИТ или отделителна система, не е необходимо ежесмесно определяне на IgG нивото.

Дългосрочно проследяване на пациенти на терапия с имуноглобулин-съдържащи препарати. Оценка на вирусологичния статус на пациента за хепатит А, В и С чрез PCR (polymerase chain reaction). За стандарт в страните от Европейския съюз е прието веднъж годишно изследване за хепатит С с PCR.

За мониторинг на страничните ефекти от имуноглобулиновата заместителна терапия се препоръчва на всеки 6-12 месеца да се изследват серумен креатинин и чернодробни ензими.

Скриниране за други усложнения и заболявания

1. Препоръките за скриниране в насока карцином са като тези при хора с интактна имунна система. Пациенти с ПИД с определени диагнози, като например тези със CVID, особено с първична лимфаденомегалия, могат да бъдат проследени с извършване на цялостна оценка на белодробната функция, компютър-томографско изследване (КТ), ядрено-магнитен резонанс (ЯМР) и/или PET скан.

2. Оценката при съмнение за лимфом е както при пациентите без хипогамаглобулинемия. Полезни скриниращи тестове в насока злокачествено заболяване включват изследване на пикочна киселина, лактат дехидрогеназа (LDH), СУЕ. При съмнение за HIV инфекция е необходимо провеждане на PCR тест.

Ваксинации

1. Пациентите на регулярна имунозаместителна терапия чрез инфузионния продукт получават пасивно антитела към ваксинални антигени. Това определя липсата на необходимост от провеждане на ваксинации, докато пациентите са на имунозаместително лечение. Някои имунолози препоръчват противовирусна ваксинация, но пациентите не отговарят адекватно на ваксината с образуване на антитела.

2. Необходима е обаче редовна имунизация на всички членове на домакинството с убитите ваксини, особено поставяне на годишна противовирусна ваксина, напр. срещу грип.

3. Пациентите с тежки антителни дефицити (XLA, CVID) не бива да бъдат имунизирани с ваксина срещу жълта треска, жива атенюирана противогрипна ваксина и ваксина срещу кореман тиф.

4. Членовете на техните семейства, както и всички в близък контакт с пациента, обаче е необходимо да бъдат ваксинирани с гореизброените ваксини, тъй като при другите не е наблюдавана трансмисия на вирулентни щамове при имунодефектните пациенти.

5. Към момента информацията за вредата, която BCG и ротавирусната ваксина могат да нанесат при имунизация на пациенти с хуморален имуноен дефицит, не е точно дефинирана, но трябва да се има предвид, че при пациенти със CVID се наблюдават и различни Т-клетъчни промени.

6. Като цяло, препоръчва се да се избягват живите ваксини, но има и изключения, поради което пациентите трябва да се консултират с клиничен имунолог и индивидуално да се прецизира съотношението полза/риск от прилагането на конкретна ваксина. Налична е обобщена информация (ръководство) за ваксинациите при пациентите с ПИД.

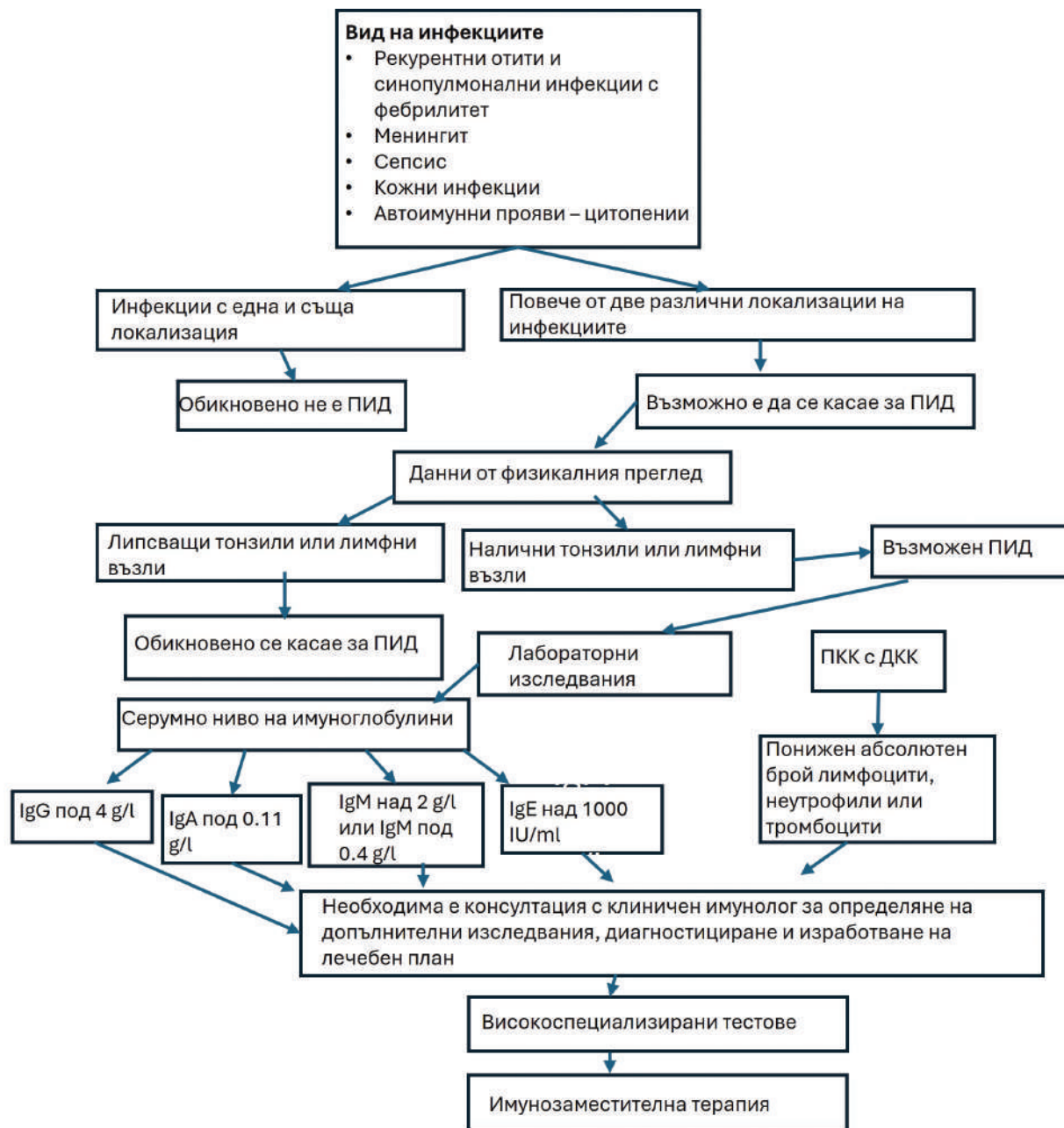
Молекулярна диагностика и имунологична консултация

Подлежащите генетични дефекти при голяма част от антителните дефицити към момента са все още неустановени. Това е в сила при повечето пациенти със CVID и селективен IgA дефицит, където подлежащият генетичен дефект може да се установи при по-малко от 10% от пациентите. Поради това генетичната консултация в семейства с тези заболявания е затруднена. Без дефинирането на подлежащия молекулен дефект начинът на унаследяване и очакваната честота са трудно предвидими, макар че фамилната анамнеза може да бъде от полза. Трябва да се има предвид обаче, че тези нарушения могат да възникнат и спорадично и в такъв случай фамилната история е неинформативна. Независимо че подлежащият генетичен дефект е неизяснен, е установено, че сред членовете на семейства с болен със CVID или селективен IgA дефицит се наблюдава повишен риск от развитие на антителни дефицити или автоимунни заболявания.

При липса на установен генетичен дефект е невъзможно провеждането на пренатална диагноза. При друга част от антителните дефицити, включващи пациентите с XLA и повечето пациенти с хипер-IgM синдром, са известни подлежащите генетични дефекти. Тези заболявания се унаследяват или Х-свързано рецесивно, или автозомно-рецесивно. Тъй като мутации в различни гени могат да доведат до развитие на тези заболявания, е необходимо провеждане на молекулярногенетичен анализ за детекция на засегнатия ген и вида на мутацията. Това би могло да даде възможност в известна степен да се предвиди клиничното протичане при засегнатото лице.

Идентифицирането на подлежащия генен дефект, както и добре снетата фамилна анамнеза, могат да подпомогнат определянето на начина на унаследяване, риска за засягане на други членове на семейството, както и идентифициране на жените носители при Х-свързания начин на унаследяване. Генетично изследване на пациентите, носителите и пренатална диагностика при някои от заболяванията могат да бъдат извършени в редица генетични лаборатории.

Фигура 2. Диагностичен алгоритъм при антителни дефекти



С. ДЕФИЦИТИ В СИСТЕМАТА НА КОМПЛЕМЕНТА

Систематизирането на клетъчните дефекти в зависимост от МКБ-10 е представено на таблица 4.

Таблица 4. Дефицити в системата на комплемента

Заболяване	Наименование	МКБ-10 наименование	МКБ-10 код
Дефицит на C1 естеразен инхибитор	Наследствен ангиоедем	Дефекти в комплементната система	D84.1
Дефицити в компоненти на комплемента (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, т.н.)	Комплементен дефицит	Дефекти в комплементната система	D84.1
		Други уточнени нарушения на имунния механизъм, неклассифицирани другаде	D89.8
		Системно ангажиране на съединителната тъкан, неуточнено	M35.9

Диагноза

Диагностичният алгоритъм при съмнение за дефект в комплементната система е представен на фигура 3.

Системата на комплемента е важна част от вродената имунна система и главен ефекторен механизъм на хуморалния имунитет. Тя също осигурява мост между вродените и адаптивните имунни отговори чрез рецептори на В-лимфоцити и антиген-представящи клетки (APC).

Пълните генетични дефицити на комплементните протеини са редки, около 0,03% в общата популация за всеки наследен пълен дефицит, с изключение на дефицит на MBL.

Най-честите клинични прояви на пациенти с дефицит в системата на комплемента са:

- повтарящи се инфекции с капсулирани бактерии
- повтарящи се инфекции с причинители род *Neisseria*
- системни автоимунни заболявания.

Оценката на комплементната система е подходяща за пациентите с епизоди на бактериемия, менингит или системна инфекция, причинени от род *Neisseria* (*N. meningitidis* или *N. gonorrhoeae*). Еднократна системна инфекция с причинител *Neisseria* налага тестване на компонентите на комплемента.

- Дефицитите в ранните компоненти от системата на комплемента – C1q, C1r /s, C4 или C2, могат да се извият с рецидивиращи пневмококови инфекции: отит, пневмония или бактериемия. Също така може да има съпътстващ антителин дефицит вследствие на лошо улавяне на антигена от дендритните клетки. Пациенти с дефицит в ранните компоненти на комплемента, развиват много по-често системен лупус еритематозус (SLE), отколкото инфекции. Кожен лупус и други прояви на автоимунитет се наблюдават, особено при дефицит на C1, C2 или C4.

- Дефицитът на C3 е много рядък. Първичен дефицит на C3 се причинява от мутация в C3 гена. Придобит дефицит на C3 се дължи на дефицит на фактор H, фактор I и нефритни фактори. Най-често срещаната клинична картина е с повтарящи се животовастрашаващи инфекции в ранна детска възраст (преди 2-годишна възраст), понякога последвани от имунокомплексни заболявания (респираторни бактериални инфекции, бактериемия, менингит, развитието на мембранопролиферативен и мезангиокапилярен гломерулонефрит и автоимунни заболявания).

- Инфекции от род *Neisseria* при деца и юноши насочват към C5-9 или пропердинов дефицит. Периодични инфекции на централната нервна система (ЦНС) се срещат по-често при афроамериканците, отколкото при бялата раса с дефицит в системата на комплемента. Инфекции на пикочните пътища също се наблюдават.

- Наследственият ангиоедем се дължи на дефицит на C1 естеразен инхибитор. Пациентите се оплакват от рецидивиращи епизоди на коремна болка, повръщане и оток на ларинкса. Диагнозата може да се постави въз основа на клиничната поява на ангиоедем (подуване) и многократното откриване на намалени количества на C1 инхибиторен протеин или активност и понижени нива на C4. Нивото на C1q, когато се измерва едновременно, е нормално.

Лабораторни и имунологични изследвания

Серумните C4 комплемент и C1 естеразният инхибитор (антигенен и функционален) са водещи изследвания за наследствен ангиоедем, където се откриват понижени.

- При определянето на комплементни дефицити CH50 тестът е отличен скринингов тест, но трябва да се работи с кръвта изключително внимателно – виж по-долу. Дефектите на алтернативния път могат да бъдат проверени с тест АН50. Идентификация на определен компонент, който липсва, изисква проучвания в изследователска или специализирана лаборатория.

- За екзактна диагностика правилното събиране на кръвни проби е много важно. Като цяло: ако не се открива CH50, пациентът вероятно има дефицит в системата на комплемента; ако CH50 е нисък, по-вероятно е пробата да не е била обработена правилно (съхранена или изпратена при -70 °C) или се дължи на автоимунно заболяване.

Мениджмънт и дългосрочно наблюдение

– Антибиотичната профилактика може да бъде подходяща при дефицит на всеки от компонентите в каскадата на комплемента. Менингококова ваксина и/или антибиотична профилактика е препоръчителна за всяко лице с диагноза C5 до C9 дефицит.

– Всички пациенти с комплементен дефицит трябва да бъдат имунизирани с ваксина за превенция на пневмококова инфекция. Ранно разпознаване на симптомите и бърза оценка (включително хемокултури) е много важно. Останалите ваксини по имунизационен календар могат да бъдат поставяни, защото В- и Т-лимфоцитите при тези пациенти са нормални.

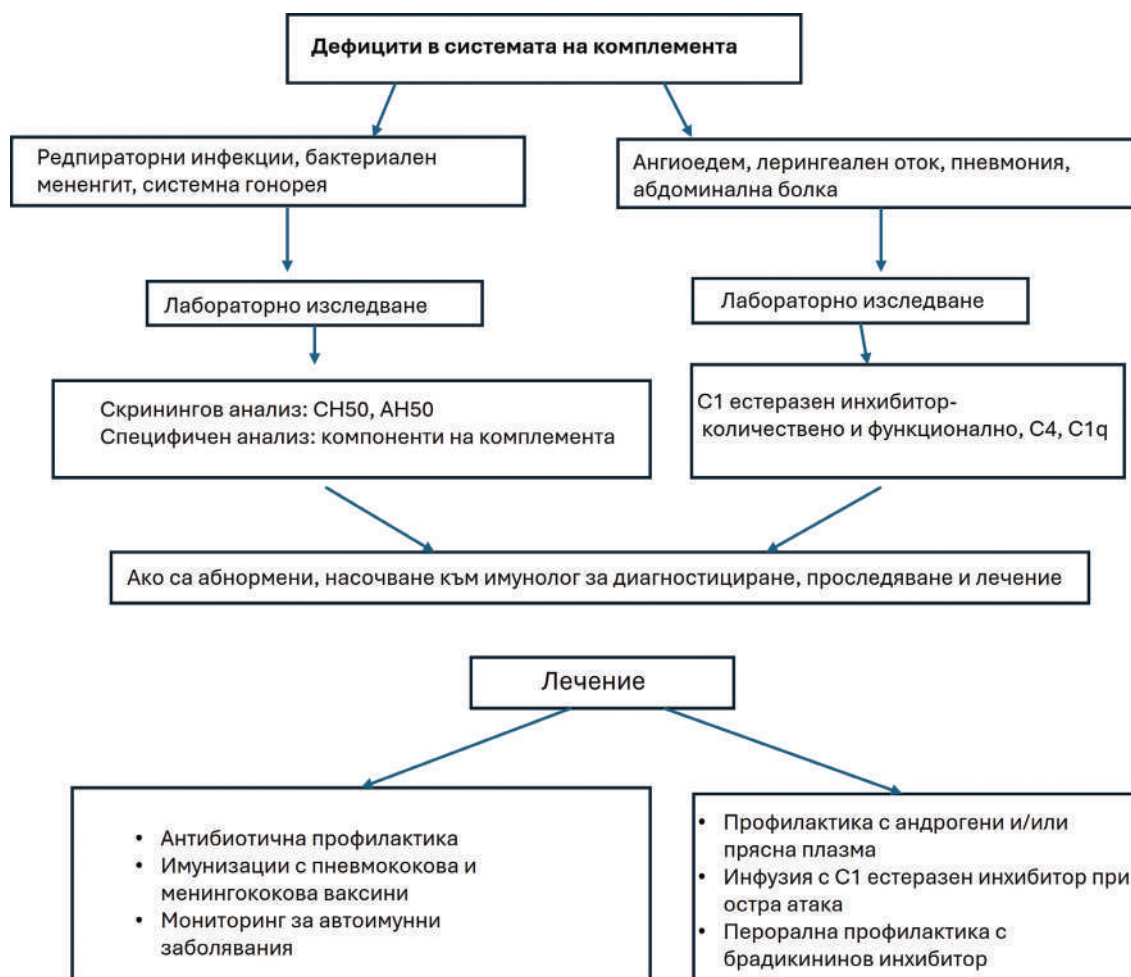
– Усложненията на дефицитите на комплемента включват автоимунни заболявания, особено системен лупус еритематозус, lupus-like синдроми, гломерулонефрит и инфекции.

– Манозасвързващият лектин (MBL) е протеин от вродената имунна система и участва в опсонизация и фагоцитоза на микроорганизми. Сам по себе си дефицитът на MBL няма сериозна клинична изява. Въпреки това е относително чест и може да влоши клиничната изява на други заболявания, като например кистична фиброза.

Молекулярна диагностика и имунологична консултация

При всички дефекти на комплементната система е известен генетичният дефект. За повечето компоненти унаследяването е автозомно-рецесивно и експресията е кодоминантна. Генетичната причина за дефицит на C1 естеразния инхибитор при наследствения ангиоедем (HAE) е известна. Заболяването се унаследява автозомно-доминантно. Фамилната анамнеза е важна при оценката на ангиоедема. Изследването на този дефект е от значение за разграничаване на наследствените от придобитите форми на ангиоедем.

Фигура 3. Диагностичен алгоритъм при съмнение за дефект в комплементната система



D. ВРОДЕНИ ДЕФЕКТИ НА ФАГОЦИТИТЕ

Вродените дефекти на фагоцитите са патогенетично, клинично и имунологично хетерогенни. Систематизирането на фагоцитните дефицити в зависимост от МКБ-10 е представено на таблица 5.

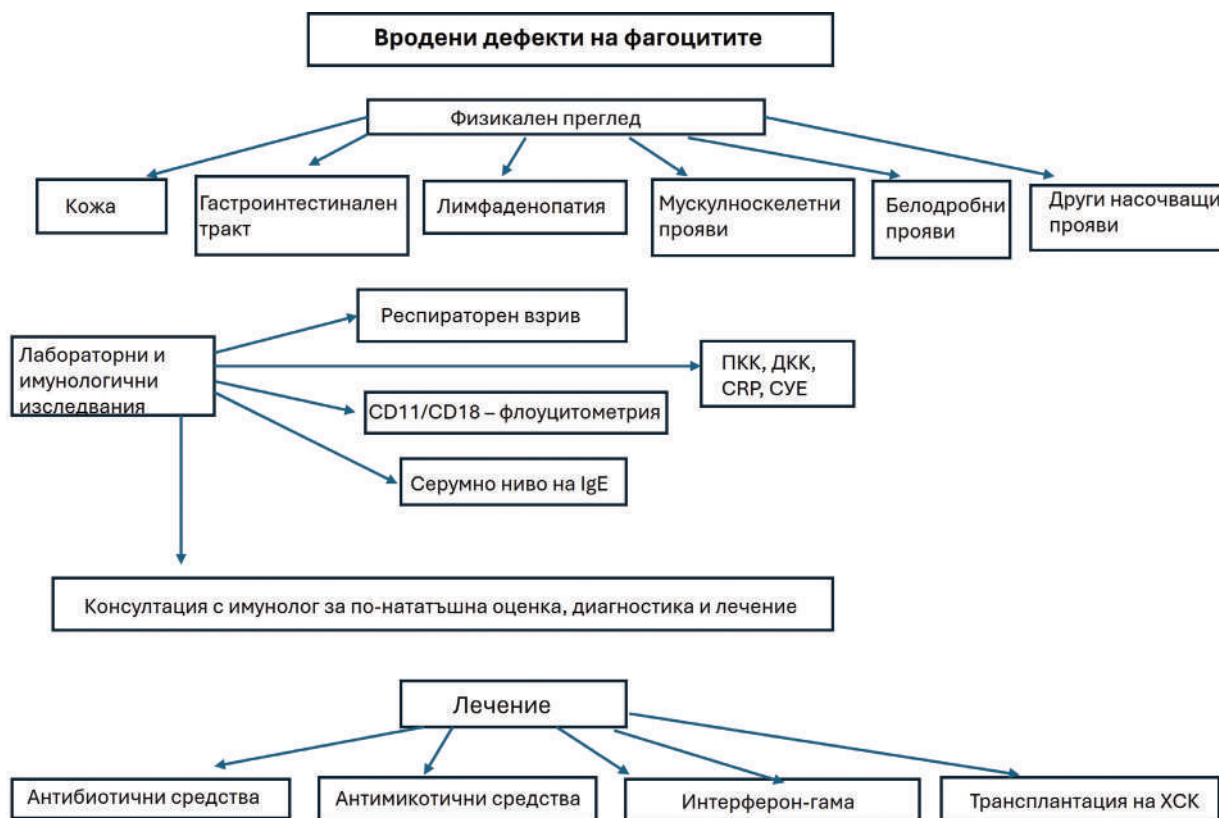
Диагноза

Оценката на имунната система е не само количествена и функционална, но и изисква допълнителни лабораторни данни, които корелират с клиничния фенотип и генотип. Клиничната картина и пълната фамилна анамнеза не винаги насочват към диагнозата и често се изисква да се проведат допълнителни специфични имунологични тестове – флоуцитометричен и генетичен анализ. Почти винаги се извършва оценка на имунния статус на пациента. Алгоритъмът за диагноза при съмнение за фагоцитен дефект е представен на фигура 4.

Таблица 5. Дефекти на фагоцитите

Заболяване	Наименование	МКБ-10 наименование	МКБ-10 код
Хронична грануломатозна болест	CGD	Функционални нарушения на полиморфно-ядрените неутрофили	D71
Синдром на Chediak Higashi	CHS	Албинизъм. Синдром на Chediak (-Stenbrinck-) Higashi	E70.3 да отпадне – в имунна дисрегулация
Дефицит на левкоцитната адхезия	LAD	Дефект на функционалния антиген-1 [LFA-1] на лимфоцитите	D84.0
Неутропения	Неутропения	Неутропения, неуточнена	D70
		Вродена неутропения	
		Циклична неутропения	
		Агранулоцитоза вследствие на химиотерапия	
		Друга медикаментозно индуцирана агранулоцитоза	
		Неутропения вследствие на инфекция	
		Друга неутропения	

Фигура 4. Диагностичен алгоритъм при вродени дефекти на фагоцитите



Началото на симптомите е в неонаталния период или в ранна детска възраст и те засягат:

- **Кожа** – абсцеси (наблюдавани при хронична грануломатозна болест [CGD] и/или целулит (наблюдавано при дефицит на левкоцитната адхезия [LAD])).
- **Лимфни възли** – може да са увеличени и да се инфектират при пациенти с CGD.
- **Забавяне в отделянето на пъпната връв** – при пациенти с LAD, което може да протече с омфалит или целулит, но без гной.
- **Остеомиелит** – наблюдаван често при пациенти с CGD.
- **Чернодробни абсцеси** – могат да се наблюдават при пациенти с CGD.
- **Белодробни инфекции** – *Aspergillus* е често срещан причинител при пациенти с CGD. Абсцеси и други инфекции могат да се причинят от опортюнистични патогени, микобактерии и/или салмонела.
- **Гастроинтестинален тракт и/или обструкция на пикочните пътища** – често се наблюдават при CGD – запек, болки в корема или гърба.
- **Уста** – възпаление на венците, язви в устата.
- Неочаквана треска без ясна причина. Миалгия и умора.

Лабораторни и имунологични изследвания

Дефектите във фагоцитите могат да се дължат на недостатъчен брой клетки, неспособност на клетките да стигнат до мястото на възпалението (нарушена адхезия или хемотаксис) или неспособност да се убият погълнатите бактерии или гъбички. Необходими са следните изследвания:

- Пълна кръвна картина и диференциално броене, за да се определи дали фагоцитиращите клетки (неутрофили) са в нормален брой. В случай на циклична неутропения тестът (абсолютен брой на неутрофили) трябва да бъде повтарян последователно (например 2 пъти седмично в продължение на 1 месец).
- Определяне на CD11/CD18, CD15 и CD18 експресия на левкоцити за изключване на LAD.
- Анализът на респираторния взрив (DHR тест чрез поточна цитометрия, заместител на NBT, определя дали фагоцитните клетки могат да произвеждат кислородни радикали, необходими за убиване на бактерии и гъбички. Неутрофили от пациенти със CGD не произвеждат тези кислородни радикали.
- Подобно на CGD, пациенти с хипер IgE синдром също имат абсцеси, въпреки че те са с нормален брой неутрофили и нормален резултат от анализа на респираторен взрив. Следователно серумното ниво на IgE трябва да се измерва при всички пациенти с рецидивиращи абсцеси.

Мениджмънт и дългосрочно наблюдение

Като цяло неутропенията е най-често вторична, резултат от лекарства или инфекция, и пациентът трябва да бъде насочен към хематолог или друг специалист за проследяване. При индивиди с първично заболяване (имунен дефицит), засягащо фагоцитните клетки, подходяща е антибиотична профилактика (триметоприм/сулфаметоксазол) или ако пациентът е алергичен към него – цефалексин. Често се използват за профилактика и противогъбични средства при пациенти с CGD.

1. Дефицитът на CD40 лиганда (CD40L или X-свързан хипер IgM) често е свързан с тежки неутропии. Хората с тежка форма на неутропения (например синдром на Kostmann) отговарят добре на терапия с гранулоцит колония-стимулиращ фактор (G-CSF), както и неутропения, свързана с CD40 лиганд дефицит. Важно е да се вземат бактериални и гъбични култури, когато тези пациенти са болни, за да се избере правилното антибиотично лечение. С подходяща антибиотична терапия пациентите със CGD живеят 40 или повече години. Въпреки това има разлики във възприемчивостта към инфекция в зависимост от типа на унаследяване (X-свързано и автозомно-рецесивно), като по-често инфекции се наблюдават при пациенти, при които заболяването е X-свързано.

2. Определянето на хемоглобин, хематокрит, СVE и/или CRP и образна диагностика на гръдния кош редовно се извършва при CGD. Ако има треска, неразположение или промяна в здравия статус, пациентът изисква незабавна медицинска помощ. Пациентите със CGD имат нормални Т-клетки и В-клетъчна функция.

3. Интерферон-гама се използва за предотвратяване на инфекции при CGD. Няма промяна в *in vitro* тестовите на функцията на фагоцитните клетки с това лечение въпреки известна клинична полза (напр. намален брой сериозни инфекции). През последните 14 години ТХСК е метод на избор при пациенти със CGD, с висока степен на преживяемост.

Ваксини. С изключение на BCG и живата салмонелна ваксина пациентите с хронична грануломатозна болест нямат противопоказания за ваксиниране и се препоръчват всички ваксини за възрастта. Пациентите със CGD или други фагоцитни клетъчни нарушения могат да посещават училище и обществени места.

Молекулярна диагностика и имунологична консултация

Генетичната причина е известна за повечето от фагоцитните имунни дефицити. Въпреки това, както при ТКИД, мутациите в няколко различни гена могат да бъдат отговорни за клинично сходни състояния. Например мутации в пет гена е известно, че причиняват хронична грануломатозна болест. В повечето случаи обичайната форма на това разстройство е Х-свързана и другите форми следват аутозомно-рецесивно унаследяване. Подробна фамилна история може да бъде полезна при определяне на вида на CGD. Въпреки това генетичното изследване е от решаващо значение за определяне на специфичния ген. С тази информация клиничната прогноза може да бъде оценена и да бъдат установени модели на наследяване в семейството. Генетичното изследване на фагоцитните клетъчни имунни дефекти се извършва в специализирани лаборатории.

Е. МЕНДЕЛОВА ПРЕДРАЗПОЛОЖЕНОСТ КЪМ МИКОБАКТЕРИАЛНА БОЛЕСТ (MSMD)

Систематизирането на клетъчните дефекти в зависимост от МКБ-10 е представено на таблица 6.

Диагноза

Алгоритъмът за диагноза при съмнение за менделова предразположеност към микобактериални заболявания е представен на фигура 5.

Менделова предразположеност към микобактериална болест може да се прояви във всяка възраст при засегнатите индивиди. Това зависи от времето на тяхното излагане на микобактерии или други специфични микроорганизми (салмонела, други грам-отрицателни бактерии, някои гъбички), към които те са силно податливи. В страни като България, където се прилага задължителна БЦЖ ваксинация при раждането, това събитие обикновено представлява първата им среща с микобактерии и води до тежка клинична инфекция.

Най-типичните клинични прояви на дисеминирана инфекция при MSMD включват:

- треска, неразположение, умора, загуба на тегло или изоставане в развитието;
- кожни папули, възли или язви;
- уголемяване на лимфни възли (лимфаденит);
- белодробни инфекции (пневмонии, абсцеси или възли);
- уголемяване на черния дроб и/или слезката;
- костни инфекции (остеомиелит);
- механични запушвания на дихателния или стомашно-чревния тракт; малабсорбция и диария.

MSMD трябва да се има предвид при всички пациенти, които боледуват от инфекции, дължащи се на нетуберкулозни микобактерии (напр. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium abscessus* или *Mycobacterium bovis* ваксинален щам BCG), всяка форма на дисеминирано микобактериално заболяване (включващо различни органи или системи) или пациенти с инвазивна салмонела или някои гъбични инфекции, като хистоплазмоза или кокцидиомикоза.

Най-честата причина за развитие на MSMD са дефектите в сигналния път на IFN- γ /IL12/IL23.

Таблица 6. Менделова предразположеност към микобактериална болест съгласно МКБ-10

Заболяване	Наименование	Описание по МКБ-10	МКБ-10 код
Interferon- γ receptor 1 deficiency	INFGR1	Генетични аномалии на левкоцити	D72.0
Interferon- γ receptor 2 deficiency IFNGR2	INFGR2	Генетични аномалии на левкоцити	D72.0
Interleukin-12 p40 deficiency IL12B	IL12B	Генетични аномалии на левкоцити	D72.0
Interleukin-12 receptor b1 deficiency	IL12B1	Генетични аномалии на левкоцити	D72.0
Signal transducer and activator of transcription 1 deficiency	STAT1	Генетични аномалии на левкоцити	D72.0
NF- κ B essential modulator deficiency	NEMO	Комбинирани имунни дефицити, неизяснени	D81.9
IKK β deficiency	IKK β	Комбинирани имунни дефицити, неизяснени	D81.9
NF- κ B inhibitor	I κ Ba	Комбинирани имунни дефицити, неизяснени	D81.9
Interferon regulated factor 8 deficiency	IRF8	Генетични аномалии на левкоцити	D72.0
Interferon stimulated gene 15 deficiency	ISG15	Генетични аномалии на левкоцити	D72.0

Лабораторни и имунологични изследвания

Имунологичната диагноза се извършва с високоспециализирани тестове за оценка на съответните сигнални пътища като: поточна флоуцитометрия за IFN γ R1, IL-12R β 1, STAT1 фосфорилиране след IFN- γ стимулация и STAT4 фосфорилиране след IL-12 стимулация.

Изисква се и генетично изследване за потвърждаване на диагнозата. При пациенти с дефекти в GATA2 се наблюдава моноцитопения (ниски моноцити в кръвта), В и NK лимфопения.

Мениджмънт и дългосрочно наблюдение

Лечението на микобактериалната инфекция при пациенти с MSMD обикновено включва:

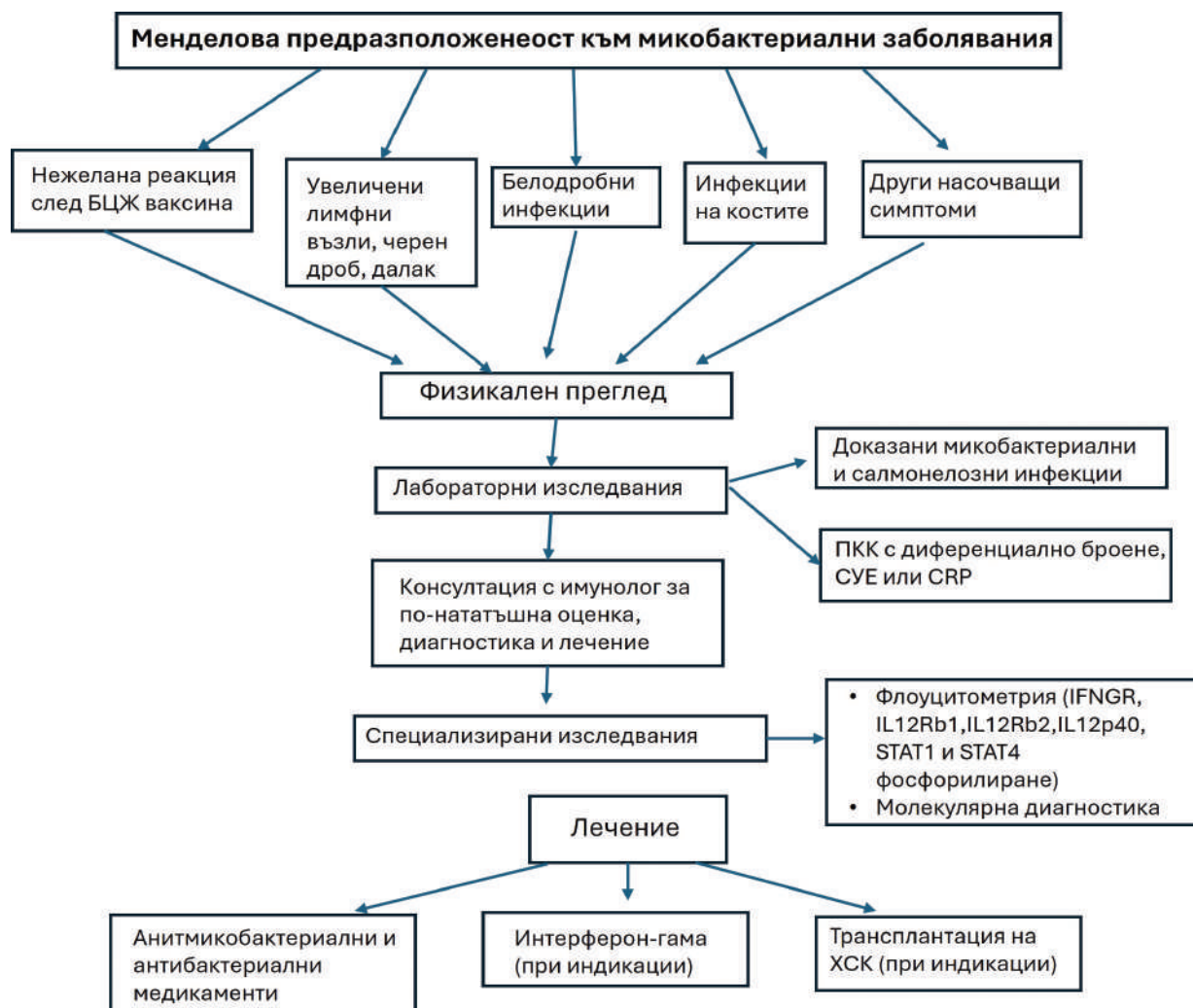
1. Мултилекарствен подход (когато се третират с един агент, микобактериите могат да развият резистентност към този антибиотик);
2. Дългосрочно лечение (някои микобактерии растат много бавно, необходими са месеци лечение за контролиране или ликвидиране на инфекцията);
3. Парентерално (интравенозно или интрамускулно) лечение. Някои от най-добрите лекарства за лечение на микобактерии са достъпни само като интравенозни препарати и когато стомашно-чревната абсорбция е компрометирана, необходимо е използването на парентерален път;
4. Използване на биологични продукти (рекомбинантен IFN-гама или IL-12) като помощни терапевтични средства;
5. ТХСК трябва да се разглежда за всеки отделен случай;
6. Редовното наблюдение за терапевтичен отговор е важно в лечението на тези инфекции. В зависимост от мястото на инфекцията, биопсии, храчки или бронхоалвеоларен лаваж могат да помогнат да се определи дали микобактериите присъстват и са живи. Образни изследвания (ултразвук, КТ, ЯМР) и лабораторни маркери на възпаление (левкоцитоза, СУЕ, ЦРП) също се прилагат за проследяване на пациентите.

Ваксинации. С изключение на BCG и жива салмонелна ваксина пациентите с MSMD нямат противопоказания и трябва да получават всички препоръчителни за възрастта ваксини. Пациентите с MSMD могат да посещават училище и други обществени места.

Молекулярна диагностика и имунологична консултация

Генетичните дефекти, свързани с MSMD, могат да се унаследяват като X-свързани (напр. NEMO defects), автозомно-рецесивни (AR) (напр. IFN γ R1, IFN γ R2, IL-12p40, IKK β , IRF8, ISG15, STAT1 и IL-12R β 1) или автозомно-доминантни (AD) (напр. IFN γ R1, IFN γ R2, STAT1, IRF8, I κ Ba). Даден ген може да се асоциира както с автозомен, така и с доминантен начин на унаследяване в зависимост от вида на мутацията. Детайлната фамилна анамнеза е важна за определяне вида на унаследяване. Важно е да се знае, че не всеки индивид, носител на мутации, свързани с MSMD, ще развие симптомите на болестта. Следователно генетичното изследване е критично за акуратната генетична консултация.

Фигура 5. Диагностичен алгоритъм при съмнение за менделова предразположеност към микобактериални заболявания



Г. ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ИМУННА ДИСРЕГУЛАЦИЯ

Според последната ревизия на IUIS класификацията от 2024 г. заболяванията на имунната дисрегулация се подразделят на седем подгрупи: FHL (фамилна хемофагоцитна лимфохистиоцитоза) синдроми, FHL синдроми с хипопигментация (CHS, GS, HPS и др.), дефекти на регулаторните Т-клетки (IPEX, CTLA4 и др.), автоимунитет със или без лимфопролиферация (APECED), имунно дисрегулаторни заболявания с колити, автоимунен лимфопролиферативен синдром (ALPS), синдроми, свързани с предрасположеност към EBV и лимфопролиферация (XLP). Систематизирането на заболяванията на имунна дисрегулация в зависимост от МКБ-10 е представено на таблица 7.

Диагноза

Общият подход за оценка и диагностика на нарушения на имунната дисрегулация е обобщен на фигура 6.

1. Нарушение на имунната дисрегулация се подозира при комбинация от клинични характеристики, при които 1 или повече от следните доминира/т: (а) автоимунитет; (б) свръхчувствителност; и (в) признаци на лимфопролиферация като дифузна лимфаденопатия, хепатоспленомегалия или и двете.

2. Клиничният ход на заболяванията може да бъде както остър или фулминантен с висока температура, интоксикаран външен вид и признаци на лимфопролиферация, така и подостър или хроничен, като са налице рецидивирани инфекции и аномалии в пигментацията.

Таблица 7. Заболявания на имунна дисрегулация съгласно МКБ-10

Заболяване	Описание по МКБ-10	МКБ-10 Код
Фамилна хемофагоцитна лимфохистиоцитоза (FHL)	Хемофагоцитна лимфохистиоцитоза	D76.1
Синдром на Chediak-Higashi (CHS)	Албинизъм. Синдром на Chediak (-Stenbrinck-) Higashi	E70.3
Синдром на Griscelli (GS) тип 2	Албинизъм. Синдром на Chediak (-Stenbrinck-) Higashi	E70.3
Синдром на Hermansky-Pudlak (HPS)	Албинизъм. Синдром на Chediak (-Stenbrinck-) Higashi	E70.3
Имунодефицит, полиендокринопатия, X-свързан синдром (IPEX)	Автоимунна полигландуларна недостатъчност	E31.0
Автоимунна полиендокринопатия – кандидоза – ектодермална дисплазия (APECED)	Автоимунна полигландуларна недостатъчност	E31.0
Автоимунен лимфопролиферативен синдром (ALPS)	Новообразуване с неопределен или неизвестен характер на лимфната, кръвотворната и сродните им тъкани, неуточнено	D47.9
X-свързан лимфопролиферативен синдром (XLP)	Имунодефицит като резултат от наследствен дефект, предизвикан от вируса на Epstein-Barr, свързана с X-хромозомата лимфопролиферативна болест	D82.3

3. Острото и фулминантно протичане може да се наблюдава при FHL, „ускорена фаза“ на CHS, GS или HPS.

4. При клиничното представяне с лимфопролиферация и автоимунно заболяване се предполага ALPS, свързани с ALPS нарушения или XLP.

5. При наличие на: (а) полиендокринен автоимунитет; (б) СМСС; или (в) многобройни хранителни алергии и/или алергии към фактори на околната среда е възможно наличието на APECED, IPEX или дефекти на CD25 или ITCH.

Ако няма съответствие с посоченото по-горе, пациентът може да има комбиниран имунен дефицит или друг синдром.

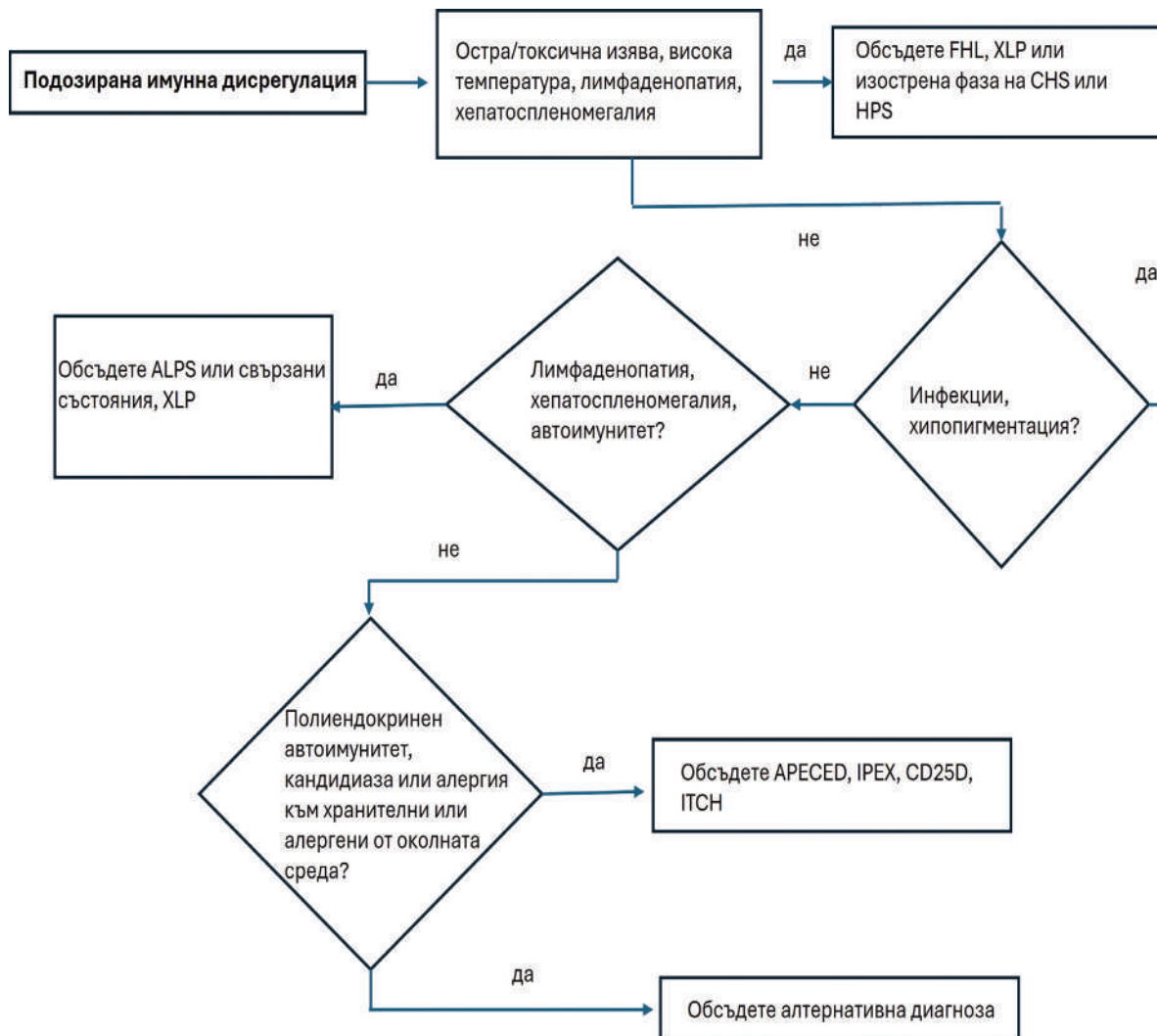
Синдром на **Chediak-Higashi (CHS)**. CHS се отнася към групата от нарушения, известни като фамилна хемофагоцитна лимфохистиоцитоза (FHL). На практика всички пациенти със CHS, които не загиват от инфекция, имат HLH, характеризираща се с висока температура, хепатоспленомегалия и неврологични признаци, вариращи от объркване и гърчове до кома. При пациенти със CHS това се нарича ускорена фаза. Тези клинични признаци са свързани с панцитопения (обикновено с анемия и тромбоцитопения), хепатит с високи нива на чернодробни ензими, хипертриглицеридемия, хипофибриногенемия, хипонатриемия и висок феритин. Без агресивно лечение изходът обикновено е фатален. CHS трябва да се подозира при пациенти с частичен окулокутанен албинизъм, бактериални инфекции и прогресивни неврологични симптоми. Инфекциите са пиогенни и засягат главно кожата, дихателните пътища и понякога други органи. Пациентите със CHS също проявяват частичен окулокутантен албинизъм и плеоморфни неврологични прояви, които могат да включват когнитивно увреждане, фотофобия и нистагъм, както и невропатии, мозъчни, гръбначни и периферни невропатии. Гингивит, орални улцерации и периодонтит се срещат често. Възможни са леки коагулационни дефекти, които да предизвикат кървене при ускорената фаза.

Синдром на **Griscelli (GS) тип 2**. GS е рядко автозомно-рецесивно разстройство. Характеризира се с пигментно разреждане, неврологични аномалии и пурулентни инфекции. Хепатоспленомегалията е честа. Пигментните промени засягат косата и кожата. Тези промени са диагностични в асоциация с другите прояви на тази група болести. Предизвиква се от мутации в RAB27A гена. Почти всички пациенти в крайна сметка имат "ускорена фаза" HLH, която често е фатална (подобно на CHS). Това е най-често срещаната клинична картина на GS.

Синдром на **Hermansky-Pudlak (HPS)**. HPS тип 2 е резултат от дефекти в гена, кодиращ b1 субединицата на адапторния протеинен комплекс 3 (AP3B1). HPS тип 2 трябва да се подозира при пациенти с хипопигментация, тромбоцитопения, неутропения и рецидивирани инфекции. Това са група от

заболявания, чиято основна клинична прояви са окулокутантен албинизъм и тежка тромбоцитопения, тромбастения или и двете. Описани са девет различни генни дефекта (HPS1-9). Всички те водят до аномалии на клетъчни гранули, донякъде подобни на тези при пациентите със CHS и GS2. Само HPS тип 2 обаче е свързан с имунна недостатъчност, причинена от тежка неутропения. HPS е важна причина за идиопатична белодробна фиброза; това усложнение рядко се наблюдава при пациенти с HPS тип 2.

Фигура 6. Диагностичен алгоритъм при съмнение за имунодисрегулационен синдром



Съкращения: FHL – фамилна хистиолимфоцитоза; XLP – X-свързан лимфопрлиферативен синдром; CHS – синдром на Chediak-Higashi; GS – синдром на Griscelli; HPS – синдром на Hermansky-Pudlak; ALPS – аутоимунен лимфопрлиферативен синдром; APECED – аутоимунна полиендокринопатия-кандидоза-ектодермална дисплазия; IPEX – имунодефицит, полиендокринопатия, X-свързан; ITCH – itchy E3 убиквитин протеин лигаза

FHL (фамилна хемофагоцитна лимфохистиоцитоза) синдроми. FHL трябва да се подозира при пациенти с повишена температура, хепатоспленомегалия и неврологични симптоми. FHL синдромите са наследствени форми на по-общия HLH. Първичната HLH често се нарича FHL. Синдромите на HLH са причинени от неконтролирано активиране на цитотоксични клетки, включително NK клетки, CD81 цитотоксични Т-клетки и макрофаги, както и свръхпроизводство на IFN-гама и TNF. Първичните и вторичните HLH и остри атаки на FHL обикновено се предизвикват от вируси, особено EBV. FHL е с аутозомно-рецесивно унаследяване с честота приблизително 1:50 000. Вторичните HLH често се свързват с друго основно хронично заболяване като ювенилен възпалителен артрит, болест на Still и

злокачествено заболяване. Всички HLH синдроми се характеризират с добре дефинирани клинични прояви и лабораторни параметри. Симптомите и признаците са висока температура, хепатит с хепатоспленомегалия и централни неврологични симптоми, вариращи от объркване до припадъци и кома. Допълнителните характеристики могат да включват лимфаденопатия, иктер, оток и неспецифичен кожен обрив. Съществуват установени диагностични критерии за HLH: (1) треска; (2) спленомегалия; (3) цитопении, засягащи най-малко 2 линии; (4) хипертриглицеридемия над 3 mmol/L или 265 mg/dL, хипофибриногенемия $< 1,5$ g/L или и двете; (5) хемофагоцитоза в костния мозък, далака и лимфните възли; (6) ниска или отсъстваща NK клетъчна активност; (7) хиперферитинемия над 500 mg/L; и (8) повишено ниво на разтворим CD25 (IL-2 рецепторна верига) над 2400 U/mL.

Лимфопролиферативни синдроми. X-свързан лимфопролиферативен синдром (XLP). Трябва да се подозира при момчета с фулминантна инфекциозна мононуклеоза с HLH, лимфоми и дисамаглобулинемия. XLP1 се причинява от мутации в гена SH2D1A (кодирана SAP). XLP2 се причинява от мутации в XIAP. Приблизително 40% от пациентите с XLP1 се представят с фулминантна инфекциозна мононуклеоза, често с HLH. Честотата на HLH при EBV отрицателни пациенти е много по-ниска от тази при EBV положителни пациенти. Ясно е обаче, че имунната дисрегулация е налице при пациентите дори преди EBV инфекцията. Около 15% от пациентите с лимфом (имунобластен сарком) и други 20% до 25% изиявяват дисамаглобулинемия. Началото на симптоматичното заболяване може да бъде най-рано към 5-и месец или в по-късна зряла възраст. При пациенти с XLP2 HLH е по-лек, дисамаглобулинемията е честа, и лимфоми не са описани. Имунологичните находки при пациенти с XLP1 са променливи и зависят от експозицията към EBV. Преди експозицията имунологичните лабораторни отклонения са ограничени главно до хипоамаглобулинемия на един или повече подкласове IgG или повишени нива на IgA и IgM. След EBV инфекция може да има хипоамаглобулинемия с нарушено производство на специфични антитела, инвертно съотношение CD4/CD8 (причинено от експанзия на CD8+ клетки), и намалени Т-клетъчни пролиферативни отговори към митогенни антигени *in vitro*. Също така често се наблюдава намалена цитотоксичност на NK клетки. Някои пациенти с XLP се диагностицират като CVID. В диференциалната диагноза се имат предвид автозомно-рецесивните разстройства, включително дефицит на IL-2-индуцируема Т-клетъчна киназа (ITK) и CD27 дефицит. Тези пациенти могат също така да проявят хронична и симптоматична EBV инфекция, късна хипоамаглобулинемия, HLH и повишен риск към развитие на лимфом, причинен от EBV и други злокачествени заболявания. EBV предизвиканата лимфопролиферация има променлив отговор към имуносупресията, включително стероиди и ритуксимаб. Смъртността е доста висока.

Синдроми с автоимунитет. Автоимунен лимфопролиферативен синдром (ALPS) и автоимунен лимфопролиферативен синдром-свързани разстройства. Подозират се при пациенти с лимфопролиферация и хепатоспленомегалия, която е неинфекциозна и немалигнена. Дефектът при пациентите с ALPS е във Fas пътя, който контролира апоптозата на Т- и В-лимфоцитите. Това води до неконтролирана пролиферация на лимфоцити и повишен лимфоцитен брой. Пациентите с ALPS са склонни към автоимунни цитопении, включително автоимунна хемолитична анемия, автоимунна тромбоцитопения и неутропения. Автоимунните цитопении често се влошават от хиперспленизъм. Други автоимунни състояния, които са свързани с ALPS, включват гломерулонефрит, автоимунен хепатит, васкулит, увеит, апластична анемия, хроничен панкреатит, тежка остеопения, ангиоедем и преходна алопеция. Тези проявления са много по-редки от автоимунните цитопении. Повечето пациенти с ALPS (60-70%) имат мутации в гена, кодиращ Fas молекулата (TNFRSF6). Следващата най-често срещана находка (10% от пациентите) са соматичните мутации, засягащи Fas. Рядко пациентите имат мутации в гена, кодиращ Fas лиганда (TNFSF6, $< 1\%$ от пациентите) и каспаза 10 (CASP10; 2-3% от пациентите). Диагнозата на ALPS се основава на изпълнението на следните критерии въз основа на консенсусна декларация от 2009 г. на NIH: (1) хронична (> 6 месеца), немалигнена, неинфекциозна лимфаденопатия, спленомегалия или и двете и (2) повишени

CD3+TCRab+CD4-CD8- двойноотрицателни Т-клетки ($> 1.5\%$ от общите лимфоцити или 2.5% от CD3+ лимфоцитите) при нормален или повишен брой лимфоцити. Тези критерии не са валидни при пациенти с лимфопения. В допълнение, един или два от следните критерии трябва да бъдат изпълнени: (1) дефектна апоптоза на лимфоцитите (в 2 отделни анализа) или (2) патогенна мутация в соматична или зародишна линия в TNFRSF6, TNFSF6 (съответно кодиращ Fas и Fas лиганд), или CASP10. Към основните симптоми може да са налице и някои допълнителни серологични маркери като: повишени плазмени нива на разтворим Fas лиганд ($> 200 \text{ pg/mL}$), повишени плазмени нива на IL-10 ($> 20 \text{ pg/mL}$), повишени серумни или плазмени нива на витамин B12 ($> 1500 \text{ ng/L}$) или повишени плазмени нива на IL-18. Повишени нива на имуноглобулини, особено IgG, също са свързани с ALPS. Имунохистологична находка от опитен хематолог също би била от полза, както и положителна фамилен анамнеза.

Автоимунна полиендокринопатия-кандидоза-ектодермална дисплазия (APECED). APECED трябва да се подозира при пациенти с имуномедирана деструкция на ендокринната тъкан, хронична кандидоза и ектодермална дистрофия. APECED, известен също като автоимунен полигландуларен синдром тип 1 (APS1), е с автозомно-рецесивно или автозомно-доминантно унаследяване с високо ниво на променлив клиничен фенотип. Основно се среща при сардинци, финландци и ирански евреи. Кандидоза обикновено се наблюдава при повечето пациенти, но рядко се среща при иранските евреи, които носят мутацията Y85C. Ендокринопатията е имуномедирана, като хипопаратиреоидизъм и надбъбречната недостатъчност са най-разпространени. Други автоимунни прояви са алоpecia areata, гонадна недостатъчност, автоимунен хепатит, автоимунен ентерит, витилиго, злокачествена анемия, тиреоидит на Хашимото и диабет тип I. Ектодермалните дистрофии включват кератопатия и дистрофия на ноктите. Всички елементи може да не присъстват при даден пациент. Пациентите с APECED или изолирани тимомии трябва да бъдат наблюдавани за развитието на СМСС, която може да възникне при наличие на автоантителата анти-IL-17A, анти-IL-17F и анти-IL-22.

IPEX (имунодефицит, полиендокринопатия, X-свързан) синдром. Трябва да се подозира при пациенти с тежък ентерит и хранителна алергия, инфантилен диабет или тиреоидит и екзема. IPEX е рядко системно автоимунно заболяване в резултат на мутации в FOXP3 гена, който се счита за главен регулатор на CD4+CD25+T-reg клетките. Липсата на T-reg клетки води до алергични и автоимунни прояви, включително тежка екзема и хранителни алергии с ентерит и ранен ендокринен автоимунитет, като диабет и тиреоидит са най-чести. Обикновено IPEX е фатален в първата година от живота. Съществуват и по-леки фенотипни изяви с по-добра прогноза. Клиничните синдроми са много сходни с тези при синдрома на IPEX и са свързани с мутации, усилващи функцията на STAT1 и STAT3 сигнализацията.

Лабораторни и имунологични тестове и диагностични насоки

За диагностиката на нарушенията на имунна дисрегулация се прилагат следните имунологични и лабораторни тестове в зависимост от нозологичната единица:

Синдром на Chediak-Higashi: Изследването на периферна кръвна натривка трябва да бъде първият диагностичен тест при съмнение за CHS. Наблюдават се гигантски азурофилни лизозомни гранули във всички гранулирани клетки, включително хематопоеични клетки и меланоцити. Те са патогномонични за CHS.

Синдром на Griscelli (GS) тип 2: Много пациенти с GS2 имат нормални скринингови имунологични тестове. Дори при инфекции лабораторните имунологични аномалии са променливи. Възможно е наличие на хипогамаглобулинемия, нарушена забавена кожна свръхчувствителност към антигени, нарушена цитотоксичност на NK клетките и неутропения. Някои пациенти са с понижен *in vitro* Т-клетъчен отговор към митогени и антигени.

Синдром на Hermansky-Pudlak (HPS): Извършва се флуоцитометрия самостоятелно или в комбинация с функционални клетъчни тестове. Оценява се вътреклетъчен перфорин, свързан с SLAM протеин (SAP) и X-свързан инхибитор на апоптоза, както и модифициран функционален тест за NK/Т-кле-

тъчна цитотоксичност на базата на откриване на CD107a (лизозомно свързан мембранен протеин 1). Като цяло появата на дегранулация при повече от 5% от почиващите си NK клетки е с 96% чувствителност и 88% специфичност в полза на първичните FHL.

FHL синдроми: характеризират се с понижена NK клетъчна цитотоксичност, намалена дегранулация на NK и CTL и понижена експресия на перфорин, която може да се установи чрез флоуцитометричен анализ.

Лимфопролиферативни синдроми: Извършва се флоуцитометричен анализ на SAP и XIAP и генетичен анализ. SAP нивата на експресия корелират добре с генетичните изменения при SH2D1A; нормалната експресия на XIAP въпреки XIAP мутациите е по-честа. Следователно откриването на нормален протеин не изключва diagnоза XLP2.

Синдроми с автоимунитет. Автоимунен лимфопролиферативен синдром (ALPS) и автоимунен лимфопролиферативен синдром-свързани разстройства

Диагностични тестове: Измерване на Т-клетки, експресиращи алфа/бета-Т-клетъчен рецептор (TCR), без CD4 или CD8 е първият скринингов тест за ALPS. CD3+ TCRab+CD4-CD8- двойнонегативни Т-клетки се откриват във висок процент.

Пациенти с клинични характеристики, съответстващи на автоимунна регулаторна (AIRE) мутация, трябва да бъдат скринирани за този дефект при възможност. Откриване на орган-специфични антитела и автоантитела срещу различни цитокини, най-често интерферон тип 1 и 2, както и IL-17 и IL-22, могат да подпомогнат диагностиката при липса на генетично тестване.

Диагноза на **IPEx синдрома** се поставя чрез определяне на Т-reg клетки в периферната кръв чрез флоуцитометричен анализ (CD4+CD25+CD127low+) или генетичен анализ на FOXP3 гена.

Мениджмънт и дългосрочно наблюдение

Първичните имунодисрегулаторни нарушения са разширяваща се група от вродени грешки на имунитета, които се характеризират с ранно начало на автоимунитет и автовъзпаление. Автоимунните и възпалителните заболявания могат значително да усложнят грижите за пациентите с дефекти в имунната регулация. Стратегиите за лечение трябва да бъдат насочени не само към клиничния спектър на автоимунитета (цитопении, ревматични заболявания и/или заболявания на гастроинтестиналния тракт), но също така и към основната молекулярна причина за имунната дисрегулация (В-клетка, Т-клетка и/или дефект в молекули на вродения имунитет). Прилаганите терапевтични подходи са най-разнообразни и са в зависимост от конкретния синдром, но най-общо се обособяват следните терапевтични стратегии: ТХСК, химиотерапия и имunosупресия, IVIG, лечение на инфекциозните усложнения и компенсиране на ендокринопатиите, лечение на усложненията от страна на гастроинтестиналния тракт, спленектомия. През последните години навлиза използването на прецизна таргетна терапия (CTLA4 фузионен протеин, инхибитор на PI3K, цитокинови блокери), която позволява промяна на аберантния имунен отговор и клинично подобрение на свързаните със заболяването прояви.

HLH трябва да се лекува с високи дози глюкокортикостероиди, химиотерапевтични и други имunosупресори и HSCT. Лечението на HLH при пациенти със CHS по принцип е идентично с лечението на HLH. Окулокутанният албинизъм и неврологичните прояви, свързани със CHS, не се коригират от ТХСК.

Човешки имуноглобулини трябва да се прилагат при пациенти с XLP и хипогамаглобулинемия/дисгамаглобулинемия и инфекции. Счита се, че IVIG осигурява известна защита към инфекция при пациенти с XLP, въпреки че няма контролирани проучвания за установяване на ефикасност. Възможно е прилагане на човешки имуноглобулини при асимптомни пациенти за предотвратяване на първични или повтарящи се EBV инфекции. Ефективността на този подход е неизвестна. Пациентите с XLP и HLH трябва да се лекуват с химиотерапия, последвана от HSCT.

Лечението на ALPS трябва да таргетира животозастрашаващите усложнения. Лимфопролиферацията и спленомегалията са относително резистентни на повлияване. Автоимунните цитопении също са трудни за лечение и не отговарят напълно на терапия с кортикостероиди или човешки имуноглобулини. Микофенолат мофетил може да подобри симптомите на автоимунитета. Рапамицин (сиролимус) ус-

пешно се използва при прогресиращи цитопении. ТХСК се прилага рядко, с изключение на пациентите с рефрактерни цитопении. Инфекциозните усложнения са рядкост при пациенти с ALPS. Въпреки това спленектомирани пациенти с ALPS имат висок риск от развитие на сепсис и смъртност поради инфекциозни усложнения. Съобщава се, че честотата на сепсис при пациенти с ALPS след спленектомия достига до 30%. Ето защо дългосрочната антибиотична профилактика е показана при пациенти с ALPS след спленектомия. Пациентите с ALPS имат висок риск от злокачествено заболяване. В-клетъчни лимфоми (ходжкинови и неходжкинови) се срещат при до 10% от пациентите с ALPS.

При пациенти с APECED трябва да се прилага имunosупресивна терапия. Имуномодулиращите лекарства могат да потиснат клиничните прояви, но трябва да се има предвид опасността от тежки инфекциозни усложнения. Изисква се задълбочена оценка на инфекциозните, ендокринните и стомашно-чревните прояви. Оценката на пациентите с APECED е комплексна поради големия брой потенциално засегнати органи. Основните лечения включват хормонозаместителна терапия на ендокринопатиите и противогъбични средства за лечение на кожно-лигавичната кандидоза.

Първоначалното лечение на пациентите с IPEX включва имунна супресия с инхибитор на калциневрина или MTOR инхибитор. Циклоспорин или такролимус намаляват ефекторната Т-клетъчна функция и могат да потиснат възпалителните и някои автоимунни прояви. MTOR инхибиторите, като рапамицин (сиролимус) увеличават броя и функцията на T-reg и могат временно да подобрят клиничните прояви. ТХСК трябва да се обсъди в началните етапи на изява на IPEX синдрома.

G. АВТОВЪЗПАЛИТЕЛНИ НАРУШЕНИЯ

Систематизирането на автовъзпалителните нарушения в зависимост от МКБ-10 е представено на табл. 8.

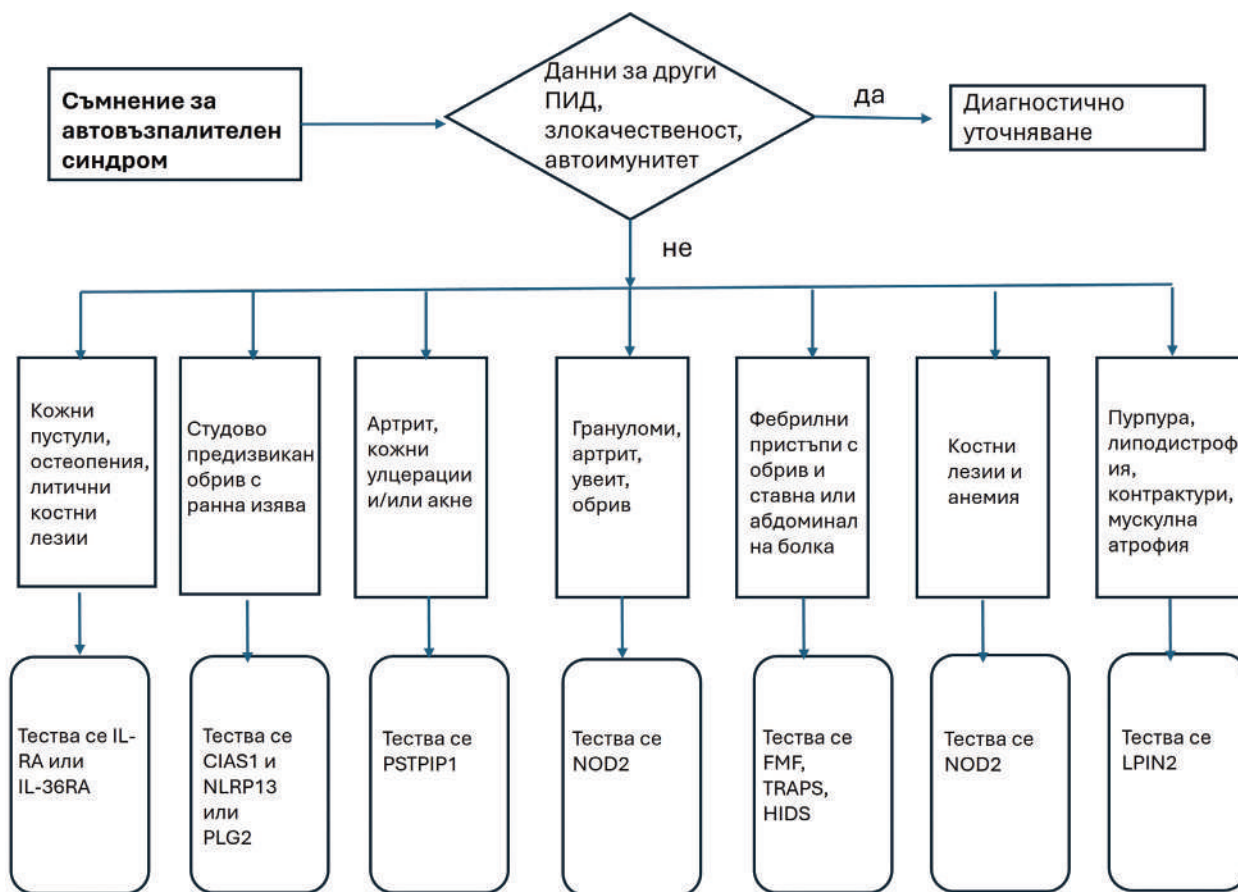
Диагноза

Автовъзпалителните нарушения са група синдроми, отличаващи се с повтарящи се пристъпи на възпаление, без характеристики на автоимунитет (т.е. без автоантитела или автореактивни Т-клетки). Тези нарушения също често се наричат синдроми на периодична треска, въпреки че тази терминология не е изцяло точна, защото е възможно да има автовъзпалително разстройство без треска и фебрилитетът обикновено е по-скоро епизодичен, отколкото периодичен. Общият подход за оценка и диагностициране на автовъзпалителни нарушения е посочен на фиг. 7.

Таблица 8. Автовъзпалителни нарушения съгласно МКБ-10

Заболяване	Описание по МКБ-10	МКБ-10 код
Криопирин-асоцииран периодичен синдром.	Наследствена фамилна амилоидоза без невропатия	E85.0
Мултисистемно възпалително нарушение с начало в неонаталния период (NOMID)	Хроничен менингит Други уточнени синдроми на главоболие Алергична уртикария Юношески артрит, неуточнен	G03.1 G44.8 L50.8 M08.9
Хроничен инфантилен неврокутанен ставен синдром (CINCA)	Наследствена фамилна амилоидоза без невропатия	E85.0
Синдром на Muckle-Wells (MWS)	Наследствена фамилна амилоидоза без невропатия	E85.0
Фамилен студов автоинфламаторен синдром (FCAS)	Уртикария от студ или топлина	D82.3
Дефицит на IL-1 рецепторен антагонист (DIRA)	Други автовъзпалителни синдроми	M04.8
Синдром на Блау	Други автовъзпалителни синдроми	M04.8
Фамилна средиземноморска треска (FMF)	Наследствена фамилна амилоидоза без невропатия	E85.0
Периодичен синдром, свързан с туморен некротизиращ фактор рецептор 1 (TRAPS)	Наследствена фамилна амилоидоза без невропатия	E85.0
Хипер-IgD синдром (HIDS)	Наследствена фамилна амилоидоза без невропатия	E85.0
Синдром на пиогенния артрит, пиодерма гангренозум и акне (PAPA).	Други автовъзпалителни синдроми	M04.8
PFAPA (синдром на периодичната треска – афтозен стоматит – фарингит-аденопатия)	Наследствена фамилна амилоидоза без невропатия	E85.0

Фигура 7. Диагностичен алгоритъм при съмнение за автовъзпалително заболяване



Пациентите с епизодична треска трябва да се изследват за други ПИД, автоимунно заболяване или злокачествено заболяване. При повтарящи се пристъпи на треска или възпаление, като например повишена СУЕ или ниво на CRP, е необходимо първо да се оцени наличието на други причини за повтарящо се или продължително възпаление. Автовъзпалителните нарушения са много редки и увреждането на органите, причинено от тези синдроми, обикновено отнема известно време. От съществено значение е изключване на други причини за повтарящи се трески или повтарящо се/продължаващо възпаление. На първо място е внимателната оценка за злокачествени заболявания, рецидивирани инфекции и автоимунитет. Измерванията на нивата на СУЕ и CRP са относително неспецифични тестове, но те трябва да бъдат извършени и повторени, за да се определи дали възпалението се дължи на продължаващ процес, или процесът е епизодичен. Необходимо е да се има предвид, че неспецифичните автоантитела (напр. антинуклеарни антитела, ревматоиден фактор, антидвуверижни ДНК антитела, антифосфолипидни и антинеутрофилно цитоплазмени) могат понякога да се установят леко или умерено повишени, особено при пациенти с неинфлазмовни дефекти.

Периодични синдроми, свързани с криопирин (CAPS). Трябва да се подозират при пациенти, които са с пристъпи на системно възпаление, водещо до обрив, треска, артрит, неврологични дефицити и амилоидоза. Мултисистемното възпалително заболяване при новородено (NOMID), наричано също хроничен инфантилен неврокутанен ставен синдром (CINCA); синдромът на Muckle-Wells (MWS) и фамилият студов автоинфламаторен синдром (FCAS) 1 представляват спектър на заболявания, характеризирани се с повтарящи се пристъпи на възпаление, предизвикано от мутации в NLRP3 гена. Всички форми се унаследяват автозомно-доминантно и началото на заболяването обикновено се появява в началото на живота. По отношение на тежестта на симптомите FCAS е най-лек, докато NOMID/CINCA са най-тежки. Фамилната анамнеза може да бъде от значение, но de novo мутации се появяват при пациентите с най-тежки форми (т.е. синдром на NOMID/CINCA). Най-леките форми на CAPS и FCAS1 обикновено се представят с

повишена температура, обрив, главоболие, конюнктивит и артралгии, предимно след излагане на студ. За разлика от студово предизвиканата уртикария (форма на физическа уртикария), локализираното излагане на студ (т.е. тест с ледено кубче) няма да предизвика пристъп при пациенти с FCAS1, защото е необходимо излагане на студено на цялото тяло. Обривът е неуртикариален (липсват едем и белези на мастоцитна пролиферация и дегрануация), състоящ се от еритематозни папули и/или плаки вследствие на неутрофилна инфилтрация, които обикновено преминават в рамките на 24 часа. Неврологичните симптоми и амилоидозата са редки. Мутациите в NLRP12 гена водят до клиничния фенотип на треска, обрив, артралгии, миалгии и главоболие при генерализирана студова експозиция. Това заболяване, наречено FCAS тип 2 (FCAS2), се проявява през първата година от живота, с атаки поне веднъж месечно. Главоболие, коремна болка, лимфаденопатия и афтозни язви също могат да бъдат наблюдавани. Пациентите с MWS се изявяват много рано в живота си с треска, обрив и ставни симптоми, които обикновено не се предизвикват от излагане на студ. За разлика от FCAS1, са налице хроничен менингит и сензороневрална загуба на слуха, ставните симптоми са по-тежки, а амилоидозата се проявява с времето. Синдромът на NOMID/CINCA е най-тежката форма на CAPS, изявява се при раждането и е с най-бърза прогресия. Всички засегнати пациенти са с обрив още при раждането. Проявите на ЦНС, включително асептичен менингит, главоболие, церебрална атрофия, увеит, загуба на слуха и умствена изостаналост, се срещат с променлива честота. Тежко засегнатите бебета могат да изостанат в растежа. Хроничната артропатия при пациенти с NOMID е тежка и деформираща поради рецидивирани пристъпи на възпаление, водещи до епифизен и пателарен свръхрастеж. Около 20% от засегнатите деца умират преди зряла възраст. Пациенти, за които се подозира, че имат CAPS или FCAS2, трябва да бъдат изследвани за персистиращи системни признаци на възпаление при липса на явна инфекция, автоимунно заболяване или злокачествено заболяване.

Дефицит на IL-1 рецепторен антагонист. Пациентите, които се изявяват непосредствено или скоро след раждане с пустулозен обрив, оток на ставите и тежка остеопения и костни лезии са суспектни за дефицит на IL-1 рецепторен антагонист (DIRA). Това е тежко автовъзпалително нарушение с преобладаващите характеристики на кожната пустулоза и костно участие. Повечето бебета развиват симптомите през първите 2 седмици, като някои от тях са с пренатален дистрес или са родени относително преждевременно (33-38 г.с.). Други характеристики включват респираторен дистрес, афтозни язви, хепатомегалия и забавяне в растежа. Костните промени обхващат дифузна остеопения, множествени остеолитични лезии, широки ребра и епифизална експанзия, донякъде подобна на наблюдаваната при пациенти с NOMID. Приблизително една трета от децата загиват от полиорганна недостатъчност.

Синдром на Блау. Подозира се при пациенти с неказеифициращи грануломи в кожата, очите и ставите. Нуклеотид-свързващ олигомеризационен домейн, съдържащ протеин 2 (NOD2)/CARD15 мутации при пациенти със синдром на Блау, водят до спонтанно активиране на NOD2 протеин, активиране на NF- κ B и продуциране на провъзпалителни цитокини. Ставната симптоматика при пациенти със синдром на Блау се изявява със синовит и теносиновит, с кистичен едем на големите стави, особено китките и глезените. За разлика от ревматоидния артрит, костната резорбция не е основна характеристика, въпреки че може да се наблюдава в проксималните интерфалангеални стави. Често се наблюдава кампилодактилия (интерфалангови контрактури). Обривът при пациенти със синдром на Блау е еритемо-макулопапулозен, с лихеноподобни папули или е подобен на еритема нодозум. Проби от биопсия показват неказеифициращи грануломи. По-рядко се наблюдават грануломатозно чернодробно заболяване, черепни невропатии, васкулит на големи съдове и интерстициален пневмонит. За разлика от саркоидозата, засягането на белия дроб е рядко.

Дефицит на IL-36 рецепторен антагонист. Пациенти с генерализиран пустулозен псориазис са суспектни за дефицит на антагонист на рецептор IL-36 (DITRA). Предизвиква се от автозомно-рецесивна мутация в гена за IL-36 рецепторния антагонист. DITRA обикновено започва през първите 2 десетилетия от живота с повтарящи се пустулозни обриви. Началото на заболяването обаче варира значително – от няколкоседмична до млада и зряла възраст. Всички засегнати пациенти са с епизоди на висока температура и еритематозен кожен обрив, който прогресира в пустули. Други симптоми включват

географски език, дистрофия на ноктите, артрит и холангит. DITRA синдромът е епизодичен, с различни тригери, най-често инфекциозни – вирусни и бактериални инфекции, менструация и бременност.

Фамилна средиземноморска треска и TNF рецептор-свързан периодичен синдром. Фамилна средиземноморска треска (FMF) или свързан с TNF рецептора периодичен синдром (TRAPS) се подозират при пациенти с повтарящи се и често продължителни пристъпи на треска, свързани със серозно, кожно и синовиално проявление. FMF е най-честият автоинфламаторен синдром. Унаследява се автозомно-рецесивно и се причинява от мутации в MEFV гена, който кодира протеина пирин/маренострин. Въпреки че FMF се счита за рецесивно разстройство, значителен процент от пациентите с клинична FMF форма имат само 1 доказана мутация в MEFV гена. FMF се среща най-често сред еврейски, арменски и турски популации и в по-малка степен при италианци, Ашкеназки евреи и араби. Средиземноморските популации и Близкият изток са с по-висока честота на носителство. Повечето пациенти се появяват клинично на възраст до 20 години и с леко преобладаване на мъжете. Атаките са променливи по тежест и епизодични, с продължителност от 1 до 3 дни и проявяващи се с възпаление на перитонеума, плеврата, ставите и/или кожата. Между атаките пациентът обикновено е без симптоми. Често треската е единствен симптом на FMF при деца, но с течение на времето обикновено се развиват други симптоми. Механизмът, който предизвиква атака, не е добре проучен, въпреки че доказани тригери са стрес и менструация. Коремните симптоми включват ригидност и силна болка, която може да имитира остър апендицит. Други симптоми са артралгия и артрит, особено при деца. Синовиалните аспирати от ставните изливи са стерилни, с преобладаване на неутрофили ($> 100\,000/\text{mm}^3$). Характерна е мускулна болка в долните крайници след физическо усилие. Еризипелоподобен еритематозен обрив може да се появи по долните крайници като изолиран признак или в комбинация с други прояви. Амилоидозата е най-тежкото усложнение на FMF. Повишаването на серумните нива на амилоид А (SAA) зависи от генетични и фактори на околната среда.

TRAPS е автозомно-доминантно автовъзпалително заболяване, свързано с хетерозиготни миссенс мутации в извънклетъчния домен на гена, кодиращ TNF рецептор 1. Пациенти с TRAPS проявяват симптоматика, много подобна на тази на FMF. По време на фебрилен пристъп пациентите с TRAPS могат да съобщят за тежка форма на коремна болка, плеврит, мигриращ обрив, мигралгия, артралгия и/или периорбитален оток. Фебрилните епизоди са по-дълготрайни, отколкото при пациенти с FMF и като цяло са непровокирани, въпреки че стресът, физически упражнения, травми и хормонални промени се съобщават като тригери.

Дефицит на мевалонаткиназа (хипер-IgD синдром). Хипер-IgD синдром (HIDS). Трябва да се подозира при пациенти с треска с лимфаденопатия, коремна болка, диария, повръщане, артралгия, обрив, афтозни язви и спленомегалия. Мевалонаткиназата (MVK) е ензим, участващ в биосинтеза на холестерол и изопrenoиди. Мутации в MVK гена са свързани със спектър от клинични фенотипи, вариращи от HIDS и треска до мевалонова ацидура, в зависимост от нивото на ензимната активност на MVK. Пациенти с HIDS имат ниска, но откриваема ензимна активност и се проявяват през целия живот с пристъпи на системно възпаление. В ранна възраст са характерни повтарящи се пикове на треска с продължителност от 4 до 6 дни, придружени от лимфаденопатия, коремна болка, диария, повръщане, артралгия, обрив, афтозни язви и спленомегалия. Възможно е развитие на болезнени еритематозни макули. Пациенти с мевалонова ацидурия имат неоткриваема ензимна активност и тежка симптоматика, включваща психомоторно забавяне, лицев дисморфизъм и забавяне в растежа. Изследванията *ex vivo* показват централна роля на IL-1 β в патогенезата на заболяването.

Пиогенен артрит, пиодерма гангренозум и акне. Синдромът на пиогенния артрит, пиодерма гангренозум и акне (PAPA) трябва да се подозира при пациенти с характерни рецидивирани епизоди на тежко възпаление на ставите и кожата. Синдромът на PAPA се причинява от мутации на усилване на функцията в ген, кодиращ взаимодействието пролин-серин-треонин фосфатаза протеин 1 (PSTPIP1). PAPA синдромът е рядък с автозомно-доминантно унаследяване. Започва в ранно детство с рецидивирал стерилен ерозивен артрит, който понякога води до значително увреждане на ставите. По време на пубертета инвалидизиращи са язвените кожни лезии, подобни на пиодерма гангренозум, често в долните крайници, и кистозна форма на акне, което продължава в зряла възраст. Микробиологичните посеви на кожните лезии и ставите са стерилни.

Протеазомна каталитична субединица b тип 8 (PSMB8 ген) и дефекти на трансмембрания протеин 173 (TMEM173; стимулатор на интерферон). Тези нарушения трябва да се подозират при

пациенти с ранно начало на треска, системно възпаление и пурпурни плаки, причинени от кожен левкоцитокластичен васкулит. Допълнителните характеристики на дефектите на PSMB8 включват липодистрофия, контрактури и мускулна атрофия (включително кардиомиопатия); периорбитален оток; хепатомегалия; лимфни възли; забавяне в растежа. Разстройството е познато още като синдром на NakaJo Nishimura. Лабораторните изследвания при тези пациенти показват увеличаване на острофазовите маркери. Нивото на индуцирания от IFN-гама протеин също е висок. Проби от биопсия на пурпурните плаки на кожата показват дермални неутрофилни инфилтрати. Описаните досега дефекти на TMEM173 са доминантни мутации на усилване на функцията при хетерозиготни пациенти. В допълнение към системното възпаление и кожния васкулит (често с дистрофия на ноктите) тези пациенти могат да развият интерстициална белодробна болест с фиброза и медиастинална аденопатия. Някои пациенти също могат да имат артрит, мускулна атрофия или и двете.

Хроничен рецидивиращ мултифокален остеомиелит, дизеритропоетична анемия (или Majeed) синдром. Синдромът на Majeed трябва да се подозира при поява на хроничен рецидивиращ мултифокален остеомиелит (CRMO) при пациенти в ранна детска възраст, вродена дисеритропоетична анемия и дерматоза. CRMO може да се появи спорадично или като автозомно-рецесивен автовъзпалителен синдром (синдром на Majeed) и се причинява от мутации в липин 2 (LPIN2) гена.

Синдромът на PFAPA е най-често срещаното автовъзпалително състояние. Той е сравнително доброкачествен, самоограничаващ се и спорадичен. Наименованието му произлиза от основните симптоми, с които се характеризира: периодичен фебрилитет (*periodic fever*), афтозен стоматит (*aphthous stomatitis*), фарингит (*pharyngitis*) и увеличени лимфни възли (*adenitis*). PFAPA засяга главно децата с начало обикновено преди 5-годишна възраст. Фебрилните пристъпи продължават средно 5 дни и се случват с точна периодичност приблизително на всеки 28 дни. Характеризират се с продромни прояви, включително умора, втрисане и язви на устните и устната лигавица, последвани от цервикален аденит, фарингит и висока температура.

Лабораторни и имунологични тестове и диагностични насоки

Периодични синдроми, свързани с криопирин (CAPS), FCAS1, MWS и NOMID се изявяват с изразен острофазов отговор, с левкоцитоза, неутрофилия, анемия и тромбоцитоза. СУЕ и CRP обикновено са постоянно увеличени. Бебета или малки деца с характерен обрив и лабораторни маркери, показващи възпаление, е необходимо да се преценят за наличие на CAPS след изключване на инфекциозни и автоимунни причини. При бебета с тези симптоми се изключват сепсис, неонатални инфекции и вродена (токсоплазма, рубеола, цитомегаловирус и херпес тип 2) инфекция. Диференциална диагноза се прави и с юношески идиопатичен системен артрит. Анализ на последователността на NLRP3 гена потвърждава диагнозата. Блокиране на IL-1 с анакинра, рилонасепт или канакинумаб може да подпомогне диагностицирането.

Лабораторните аномалии при пациенти с DIRA обикновено отразяват реакцията на острата фаза с повишени нива на СУЕ и CRP, левкоцитоза, анемия и тромбоцитоза.

Лабораторните резултати при пациенти със синдром на Blau обикновено са нормални. Антинуклеарните антитела са или отрицателни, или с нисък титър, а ревматоидният фактор обикновено е отрицателен. Ангиотензин-конвертиращите ензимни нива могат да бъдат нормални или повишени. Възможна е хипергамаглобулинемия.

Лабораторната оценка по време на пристъпи при пациенти с DITRA показва левкоцитоза и повишени нива на СУЕ и CRP. Не се съобщава дали тези стойности се нормализират между епизодите.

Пациенти, за които се подозира, че имат FMF или TRAPS, трябва да бъдат изследвани за постоянни системни признаци на възпаление при липса на доказана инфекция или автоимунно заболяване. Повишени серумни нива на СУЕ, CRP, серумен амилоид и комплемент, често с левкоцитоза и тромбоцитоза, съпровождат атаките. Хронично повишените нива на серумен амилоид могат да доведат до системна амилоидоза и животозастрашаващи увреждания на органи. Устойчиви нива над 10 mg/L се свързват с развитието на амилоидоза.

Пациентите със съмнение за HIDS трябва да бъдат изследвани чрез измерване на серумния IgD и нивата на мевалоновата киселина в урината. Между атаките може да се открият повишени нива на серумния IgD и обикновено са придружени от повишени нива на IgA. Въпреки това при 22% от паци-

ентите с HIDS се установяват нормални нива на IgD и следователно един нормален резултат не може да изключи диагнозата. Повишени нива на мевалонова киселина могат да бъдат открити в урината по време на атаки. HIDS се среща предимно при пациенти с европейски произход; приблизително половината от съобщените случаи са при холандски пациенти. Клинични диагностични критерии с висока чувствителност са ранно начало на заболяването и болки в ставите по време на атака, която трае по-малко от 14 дни. Други предполагащи критерии включват повишени нива на серумния IgD (> 100 IU/L) и настъпването на първата регистрирана атака след поставяне на ваксина. Окончателната диагноза може да изисква генетично тестване. Клиничните критерии, изискващи генетични изследвания, включват ранно заболяване, лимфаденопатия, кожен обрив, преходна болка в ставите, европейден етнически произход. Генетичният скрининг за HIDS включва V377I, най-честата мутация на MVK.

При хроничен рецидивиращ мултифокален остеомиелит дизеритропоетична анемия (или Majeed) синдром и повишената СУЕ са маркери за заболяването.

При синдрома на PFAPA в съответствие с другите автоинфламаторни синдроми, броят на белите кръвни клетки, острофазовите протеини и провъзпалителните цитокини (INF-гама, IL-6 и TNF-алфа) се повишава по време на фебрилни епизоди. Няма специфичен диагностичен лабораторен тест за PFAPA, както и известна генетична основа.

Мениджмънт и дългосрочно наблюдение

Периодични синдроми, свързани с криопирин. IL-1 инхибитори (анакинра, рилонасепт, канакинумаб) трябва да се прилагат при всички пациенти с CAPS и може да са ефективни за FCAS2. Доказано е, че IL-1 инхибиторите индуцират бърз и устойчив отговор при пациенти с CAPS. Впоследствие е доказано, че рилонасепт (IL-1R-IgG Fc слят протеин) и канакинумаб (анти-IL-1b mAb) също са ефективни. Важно е, че IL-1 блокирането подобрява дългосрочната заболяемост, като загуба на слуха, ставни деформации и амилоидоза. Ограничаването на излагането на студ изглежда ефективно за предотвратяване атаките при FCAS1 и FCAS2. Ниски дози стероиди, антихистамини или НСПВС са умерено ефективни при някои семейства с FCAS2.

DIRA. Анакинра или други антагонисти на IL-1 трябва да се използват терапевтично или диагностично. Кортикостероидната терапия намалява продължителността на епизодите, но не засяга честотата, нито предотвратява усложненията на заболяването.

Синдром на Блау. Кортикостероидите трябва да бъдат в основата на лечението при пациенти със синдром на Blau.

DITRA. Ретиноидите са в основата на лечение на DITRA, въпреки че се използват също стероиди и IL-1 инхибитори. Повечето пациенти с това разстройство са лекувани с ацитретин, перорален ретиноид, който е от полза, тъй като спирането на лечението е свързано с рецидив на симптомите.

Фамилна средиземноморска треска и TNF рецептор-свързан периодичен синдром. Колхицинът трябва да бъде в основата на терапията на FMF. Ежедневният прием на колхицин води до облекчаване на симптомите при 95% от пациентите, като близо 75% постигат почти пълна ремисия. Препоръчителната поддържаща доза за възрастни е от 1,2 до 1,8 mg/ден, като може да се регулира в зависимост от телесното тегло при по-млади пациенти. Коремните болки и диарията са най-честите нежелани реакции, като с плавно увеличаване на дозата е възможно да бъдат ограничени. Колхицинът също може да причини непоносимост към лактоза. Напоследък IL-1 антагонисти са използвани успешно при някои пациенти без отговор към колхицин.

TRAPS. Кортикостероиди, TNF блокери и IL-1 антагонисти трябва да се използват в терапията на TRAPS. При по-редки атаки е възможно да бъдат ефективни краткотрайни курсове на преднизон. За по-тежко протичане се предпочита етанерцепт, който намалява симптомите на възпаление в зависимост от дозата, без гаранция за трайна ефикасност. Да се има предвид, че инфлексимаб може да причини парадоксални възпалителни реакции. Съобщава се за добър ефект от приложение на анакинра, както и на анти-IL-6 рецепторните антитела (тоцилизумаб).

Дефицит на мевалонаткиназа (хипер-IgD синдром). Хипер-IgD синдром (HIDS). Терапевтични проучвания с използването на кортикостероид и инхибитори на възпалителни цитокини при пациенти с HIDS са в ход. Кортикостероидите, приложени във високи дози при първия признак на атака, намаляват тежестта и продължителността на симптомите при някои пациенти. Повечето съобщения показват

значителен благоприятен ефект от инхибитори на TNF- α и IL-1 β . Други агенти с ограничена полза включват IVIG, колхицин, циклоспорин и холестеролови инхибитори, като например симвастатин.

Пиогенен артрит, пиодерма гангренозум и акне. Лечението на пациенти с RAPA синдром е с инхибитори на цитокини. Артритът може да отговори на терапията с кортикостероиди; въпреки това свързаните неблагоприятни ефекти често ограничават употребата им. Има няколко съобщения за успешно лечение с IL-1 рецепторни антагонисти анакинра) и инхибитори на TNF- α (etanercept) и инфликсимаб.

Протеазомна каталитична субединица b тип 8 (PSMB8 ген) и дефекти на трансмембрания протеин 173 (TMEM173; стимулатор на интерферон). При пациенти с PSMB8 или TMEM173 трябва да се опитат различни противовъзпалителни модулатори: стероиди; инхибитори на TNF- α , IL-6 и IL-1; или и двете. In vitro данните показват, че Janus инхибитори на киназата могат да бъдат обещаваща терапевтична модалност.

Хроничен рецидивиращ мултифокален остеомиелит-дизеритропоеична анемия (или Majeed) синдром. Различни противовъзпалителни средства трябва да се изпробват при пациенти със синдром на Majeed. Лечението с перорални стероиди и НСПВС е с променлив ефект. Обсъжда се ефикасността на IL-1 инхибиторите, използвани при 2 пациенти, подчертавайки участието на автоинфламаторни пътища.

Синдромът на PFAPA. Първоначалното лечение на синдрома на PFAPA трябва да бъде с перорални глюкокортикоиди по време на остри епизоди. За разлика от други автоинфламаторни синдроми, използването на единична доза от 1 до 2 mg/kg перорален преднизон, приложен незабавно в началото на симптомите, е много ефективно по отношение на прекъсване на фебрилните епизоди, въпреки че не предотвратява повторение и може да намали интервала между епизодите. Допълнителни дози преднизон може да се използват за предотвратяване на рецидивите на симптомите. Симетидин (20-40 mg/kg/ден) в разделени дози предотвратява появата на рецидив. Съобщава се за благоприятен ефект от тонзилектомията, администриране на IL-1 β рецепторни антагонист, и добавяне на витамин D. НСПВС, антибиотици и колхицин обикновено са по-малко ефективни при лечение и предотвратяване на възпалителните епизоди. Прогнозата е добра, с тенденция към затихване на симптомите средно 5 години след началото.

Молекулярна диагностика и имунологична консултация

Цели се потвърждаване на клинична диагноза (особено при припокриващи се или атипични случаи); разграничаване между синдроми с подобни проявления (напр. FMF срещу TRAPS); насочване на решението за лечение, като например IL-1 инхибитори; осигуряване на генетично консултиране за семействата; идентифициране на носители или информиране на репродуктивните решения. Консултирането преди молекулярния тест включва обяснение на моделите на унаследяване, обсъждане на последиците от резултатите (положителни, отрицателни, VUS – вариант с неясна значимост), осигуряване на информирано съгласие. Консултирането след теста включва: интерпретиране на резултата в клиничен контекст, насочено внимание към VUS и евентуалната необходимост от семейни проучвания, насочване към възможностите за лечение (напр. таргетни биологични препарати), определяне на риска от носителство и семейното планиране. Предизвикателства: VUS са често срещани поради рядкостта на състоянията.

Непълната пенетрантност и променливата експресивност усложняват интерпретацията. Етнически специфични мутации (напр. MEFV в средиземноморските популации). Клиничната картина трябва да насочва тестването – не всички повтарящи се трески изискват генетично изследване.

ЛИТЕРАТУРА

1. Immune Deficiency Foundation Diagnostic & Clinical Care Guidelines for Primary Immunodeficiency Diseases, ed. R. H. Buckley, 3d ed., 2015.
2. Bonilla FA et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency, J Allergy Clin Immunol, November 2015.
3. Paris K, Wall LA. The Treatment of Primary Immune Deficiencies: Lessons Learned and Future Opportunities. Clin Rev Allergy Immunol. 2023 Aug;65(1):19-30. doi: 10.1007/s12016-022-08950-0. Epub 2022 Jul 1.
4. Chellapandian D, Chitty-Lopez M, Leiding JW. Precision therapy for the treatment of primary immunodysregulatory diseases. Immunology and Allergy Clinics. 2020;40(3):511–526. doi: 10.1016/j.iac.2020.04.001.
5. Practical approach to diagnosis and management of primary immunodeficiency diseases October 2018 Official journal of the South African Academy of Family Practice/Primary Care 60(5):42-49 DOI:10.4102/safp.v60i5.4914

2. Диагностични имунологични подходи при автоимунни заболявания

А. ОБЩОВАЛИДНИ ПРАВИЛА НА СЕРОЛОГИЧНАТА ДИАГНОСТИКА НА АВТОИМУННИТЕ БОЛЕСТИ

- Изследването се назначава при налична клинична симптоматика и основателни съмнения за диагнозата.
- Назначаването и изследването на автоантитела се извършва последователно с цел потвърждение, доизясняване или диференциална диагноза на suspectното заболяване.
- Интерпретацията на получените резултати винаги се прави в контекста на наличната клинична симптоматика в сътрудничество между имунолог и съответен клиничен специалист.

В. ДИАГНОСТИЧНИ ИМУНОЛОГИЧНИ ПОДХОДИ ПРИ СИСТЕМНИ АВТОИМУННИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

1. Системен лупус еритематозус (СЛЕ)

Изследването за антинуклеарни антитела (ANA) е високочувствително за диагнозата на системен лупус еритематозус и лекарствено индуциран лупус – над 95% от болните със заболяването са положителни, но ANA се срещат и при други автоимунни болести, като автоимунен хепатит, васкулити, подостър бактериален ендокардит, HIV инфекция, карциноми, болни със силиконови импланти, възрастни хора и дори при здрави лица. Това намалява тяхната диагностична специфичност. Отрицателният резултат при липса на клинична картина е добър маркер за отхвърляне на част от системните автоимунни заболявания. Характерният образ на положителни ANA, определен спрямо критериите на ICAP (International consensus of ANA pattern), би могъл да насочи към изследване на характерни ANA специфичности. Болни, които показват положителен резултат за ANA скрининг, по-нататък се изследват за определяне специфичността на автоантителата, намиращи се в серума. Анти-Sm антителата са най-специфичните антитела за СЛЕ, но се срещат при сравнително малък процент от болните (10–30%). При СЛЕ могат да се позитивират и редица други антинуклеарни специфични антитела като анти-Ro (SS-A), анти-La (SS-B), които обикновено са свързани с някои проявления на СЛЕ, като неонатален лупус, вроден сърдечен блок, субакутен кожен лупус, левкопения. Наличие на антифосфолипидни антитела, като лупусен антикоагулант (LA), антикардиолипинови антитела (ACL) и анти- β 2-гликопротеин I антитела (β 2GPI), се установяват при около 1/3 от болните със СЛЕ и се асоциират с повишен риск от артериални и венозни тромбози и репродуктивни неуспехи. Серумните нива на комплемента (C3, C4 и CH50) също трябва да се изследват, защото това са серологични маркери, които корелират с болестната активност.

Изследването на анти-двДНК е важен и в същото време доста капризен за изследване показател. Засега се приема за най-специфичен имунофлуоресцентен тест със субстрат *Crithidia luciliae*, който обаче е с ниска чувствителност (< 50%). Доста по-чувствителни са имуноензимните методи, при които обаче е много важно качеството на антигена двДНК, неговото стабилно прикрепяне към субстрата и в най-подходяща конформация. Тези фактори съществено се отразяват на чувствителността и специфичността на използваните комерсиални китове, поради което могат да се получат фалшиво отрицателни резултати и разминавания в резултатите. Важно е анти-dsDNA да се изследват с добър количествен метод, тъй като стойностите представляват важен параметър в мониторирането на активността на заболяването. Наред с описаните автоантитела, важно е да се изследват и много други автоантитела, насочени срещу т.нар. „екстрахируеми нуклеарни антигени“, като анти-двДНК, хистони, nRNP/U1RNP, PCNA, RibP. Позитивирането на някои от тях корелира с определени клинични стигми, характерни за СЛЕ. Например анти-PCNA и анти-RibP могат да се асоциират с бъбречно засягане или съответно невrolупус. Антителата срещу хистони и двДНК, често се асоциират с лекарствено индуциран лупус.

СЛЕ е хронична болест, чийто ход се характеризира с периоди на активност и на ремисия. Някои болни имат хронично проявена симптоматика, други могат дълго време да останат безсимптомни. Рутинни изследвания на анти-двДНК, С3 и С4 се правят с цел мониториране на болестната активност на лупусната нефропатия (табл. 9).

Таблица 9. Интерпретация на серийни серологични промени при СЛЕ

Анти-двДНК	С3	С4	Интерпретация
↑	без промяна	без промяна	Активност, вероятна промяна в клиничното състояние
без промяна	↓	↓	Вероятно бъбречно ангажиране
↓	↓	↓	Вероятно бъбречно ангажиране
↑/без промяна	↑	↑	Вероятно инфекция, необходимо е изследване на СУЕ, CRP

Съществено диагностично значение за неонаталния системен лупус е изследването на анти-Ro/SS-A и анти-La/SS-B антитела в серума на майката и на новороденото. Положителен резултат при бременната майка предоставя възможност за избягване раждането на сериозно увреден плод.

2. Синдром на Съогрен

Синдромът на Съогрен (СС) представлява бавно прогресиращо аутоимунно заболяване, характеризиращо се с лимфоцитна инфилтрация на екзокринните жлези (най-вече слюнчени и слъзни), като в резултат се стига до редуцирана секреторна функция и сухота в очите и устата, т.нар. sicca синдром. Почти половината от пациентите развиват и екстрагландуларни прояви като лимфоцитни натрупвания в епитела на белия дроб и бъбреците, кожен васкулит, периферна невропатия и гломерулонефрит.

ANA, изследвани чрез индиректна имунофлуоресценция на HEp2 клетки, се позитивират при повече от 80% от пациентите с първичен СС, но трябва да се има предвид, че могат да са позитивни в ниски титри и при 20% от здравата популация. В 75% от случаите ANA са насочени срещу SS-A (Ro) антигена, като трябва да се има предвид, че тези антитела са положителни и при около 50% от пациентите със системен лупус еритематозус. Другото специфично антитяло е анти-SS-B (La), което е положително в около 30-50% при болни със СС и около 15-20% от пациентите с лупус. Антителата срещу La най-често са в комбинация с тези срещу Ro. При СС може да се наблюдава и ревмафактор, който е антитяло с ниска специфичност за заболяването. При наличието на васкулитна пурпура са необходими изследвания за криоглобулини.

3. Ревматоиден артрит (РА)

Ревматоидният артрит е хронично, системно аутоимунно заболяване, което засяга около 0.8-1% от населението на света. Характеризира се с хронично възпаление на синовията, водещо до прогресивна и необратима ставна деструкция. Необходимостта от бързо поставяне на диагнозата и последваща терапия с цел намаляване инвалидизирането на пациентите и подобряване на качеството на живот, налагат откриването на нови и по-специализирани серологични тестове. В серума на болните от ревматоиден артрит могат да бъдат открити различни аутоантитела, но с най-голямо значение са ревматоидните фактори (IgM-RF, IgA-RF и IgG-RF) и антителата срещу цитрулинирани пептиди. За диагнозата на РА обичайно се използва IgM-RF, който е положителен при 80% от болните. При дебюта на РА ревматоидните фактори могат да бъдат негативни и по-късно да се позитивират. В крайна сметка 20% от пациентите никога не позитивират ревматоидните фактори (серонегативен РА). Диагностичната чувствителност на IgM-RF е 69%, а специфичността – 85%. Титърът на IgM-RF може да бъде повишен и при различни заболявания: сифилис, саркоидоза, инфекциозен ендокардит, туберкулоза, лепра и паразитни заболявания, напреднала възраст, аутоимунни заболявания, а също и при 3-5% от здравата популация. Това намалява неговата диагностична специфичност. Важен е и фактът, че IgM-RF не е особено полезен в диагностиката на ранните етапи на заболяването, защото се среща при по-малко от 50% от болните с

ранен ревматоиден артрит. Все по-широко се изследват RF по класове IgM, IgG, IgA, с което се повишават чувствителността и информативната стойност на теста.

Изследването на другата голяма група антитела – АСРА (антитела срещу цитрулинирани протеини) навлезе широко в диагностиката на РА. Към тази група антитела спадат: анти-CCP (антитела, насочени срещу циклични цитрулинирани протеини), анти-MCV (антитела, насочени към мутирал/рекомбинантен цитрулиниран виментин), анти-Sa (антитела, насочени също срещу цитрулиниран виментин), както и антитела срещу цитрулинирани участъци на фибриноген, α -енолаза, колагеназа тип I и II и др. Сред тях анти-CCP и анти anti-MCV се наложиха като рутинни изследвания при съмнение за РА, като анти-CCP са включени в критериите от 2010 на Американска колегия по ревматология съвместно с Европейската лига срещу ревматизма (ACR/EULAR).

АСРА се приемат за високоспецифични (67-90%) и чувствителни (до 94-99%) серологични маркери, играещи роля в патогенезата на РА. Появата им в ранните етапи на заболяването, дори преди изявата на разгърнатите клинични симптоми, показва изключително висока предсказваща стойност за развитието на ерозии по ставните повърхности. Поради тази причина тестването на АСРА допринася за ранното откриване на потенциално по-бързо еволюиращите тежки артрити и в диференциално-диагностичен план за различаването на пациенти с други възпалителни ставни заболявания, които имат сходна клинична изява и наличие на RF. Комбинираното изследване на анти-CCP или анти-MCV с RF увеличава специфичността и чувствителността за ранната диагностика на пациенти с РА.

Ниските и високите титри на автоантителата имат различна стойност при оценката на заболяването. Високите концентрации на IgM-RF и/или АСРА обичайно корелират с ранното развитие на ерозии. За висок титър на ревматоидните фактори и АСРА се приема резултат, който е 3 пъти над горната референтна граница. Позитивирането на анти-CCP не корелира с извънставните прояви при РА, за разлика от позитивирането на RF. За мониториране на терапията най-добра корелация с болестната активност показват анти-MCV. В имунодиагностиката на РА се използват и автоантитела, насочени срещу карбамилирани антигени – анти-Carp.

В серума на болните с РА могат да бъдат открити и други автоантитела. Такива са ANA, антифосфолипидни антитела, ANCA (антинеутрофилни цитоплазмени антитела). Установяват се с различна честота – 20-50%, но тяхната диагностична стойност при РА е незадоволителна поради неспецифичността им (срещат се при редица други болести) и неизясненото отношение към патогенезата на РА.

4. Автоимунни инфламаторни миопатии (миозити – АМ)

Идиопатичните възпалителни миопатии са хетерогенна група системни автоимунни заболявания, които се характеризират с мускулна слабост, повишено серумно ниво на мускулните ензими (креатинфосфокиназа, алдолаза, лактатдехидрогеназа), ЕМГ промени, характерни патохистологични изменения и в случай на дерматомиозит – типични кожни промени. Включват пет основни типа – дерматомиозит, полимиозит, миозит с включвания, миозит, асоцииран със системни заболявания на съединителната тъкан, тумор-асоцииран миозит. В приблизително 80% от случаите с миозити се наблюдават автоантитела. Положителният тест за автоантитела е изключително важен за диагнозата, а често и показателен за прогнозата на заболяването. Разбира се, липсата на автоантитела не изключва наличието на АМ. Индиректната имуофлуоресценция, използваща HEp-2 клетки, установява АНА или в някои случаи антицитоплазмени антитела. След този скринингов метод е важно да се определи конкретната антигенна специфичност на антителата. Миозит-свързаните антитела се разделят на две групи – миозит-специфични антитела (MCAT) и миозит-асоциирани антитела (MAAT). MCAT са специфични за АМ и са представени в таблица 10.

MAAT не са специфични за АМ, установяват се и при други системни заболявания със или без клинични симптоми за миозит. Включват: анти-PM/Scl, анти-Mas, анти-Ro 60/SSa, анти-La/SSb, анти-Ro52, анти-RNPs, анти-U1snRNP, анти-Ku.

Част от автоантителата като TIF1 γ и NXP-2 често се асоциират с паранеопластично индуцирани миопатии, а други – с белодробно интерстициално засягане.

Таблица 10. Миозит-специфични автоантитела

Миозит-специфични антитела	Клинични асоциации	Честота
Анти-Jo-1	Антисинтетазен синдром	15-30%
Анти-PL-7	Антисинтетазен синдром	5-10%
Анти-PL-12	Антисинтетазен синдром	<5%
Анти-EJ	Антисинтетазен синдром	5-10%
Анти-OJ	Антисинтетазен синдром	<5%
Анти-KS	Интерстициално белодробно засягане. Артрит	<5%
Анти-Zo	Антисинтетазен синдром	<1%
Анти-YRS	Антисинтетазен синдром	<1%
Анти-SRP	Некротизиращ миозит. Лоша прогноза	5-10%
Анти-Mi-2	Дерматомиозит	5-10%
Анти-TIF1 γ	Дерматомиозит. Често асоциация със злокачествено заболяване	9-21%
Анти-CADM-140	Интерстициално белодробно засягане	19%
Анти-SAE	Дерматомиозит. Интерстициално белодробно засягане	4%
Анти-p140	Дерматомиозит. Калциноза	23%

*Адаптирана по Vencovsky *et al.*, 2012

5. Прогресивна системна склероза

Системната склероза е клинично хетерогенна, мултисистемна, прогресираща автоимунна болест на съединителната тъкан, която се характеризира с разнообразни клинични симптоми. Прогресивната системна склероза се класифицира като:

- Дифузна системна склероза
- CREST – засяга главно ръце, предмишници, по-малко лице и шия, калциноза, синдром на Raynaud, езофагит, склеродактилия, телеангиектазии
- Еозинофилен фасциит (болест на Shulman)
- Припокриващи синдроми – клинично и/или имунологично припокриване със системен лупус еритематодес, ревматоиден артрит, миозит, васкулит, синдром на Съогрен
- Системна склероза, индуцирана от химически агенти (винилхлорид, блеомицин и др.).

Наличието на автоантитела сериозно подкрепя диагнозата и увеличава диагностичната специфичност при системната склероза. При около 80% от болните се намират различни антинуклеарни антитела. Наред с тях се наблюдават и антитела, насочени срещу цитоплазмени структури. Част от автоантителата, използвани в диагностиката на системната склероза, са показани в табл. 11.

С по-ниска честота се срещат и други автоантитела като такива срещу РНК полимерази (RP11, RP155), фибрилларин, NOR90, Th/To, PM-Scl100, PM-Scl75, Ku, PDGFR, Ro-52, ендотелин I-R, ангиотензин II-R-1, VEGF-R. Част от тях са характерни за overlap синдромите с участието на системна склероза, а други са пряко ангажирани в имунопатогенезата на заболяването.

Таблица 11. Диагностично значими автоантитела при системна склероза

Антителни специфичности	Диагностична чувствителност
АНА скрининг	80%
Антицентромерни	Ограничена форма (CREST) 90% Дифузна форма 5%
Антинуклеоларни	40%
Анти-Scl-70	Дифузна форма 34-65%
Анти-RNP	10%
Анти-SSA/ Ro	< 5%
Ревматоиден фактор	25-33%

6. Първични ANCA асоциирани васкулити

ANCA асоциирани васкулити са група васкулити, некротизиращи по своя характер, които засягат малките и средните по размер съдове и протичат с разнообразни органични прояви. Тук се включват грануломатозата на Вегенер, микроскопичният полиангиит и синдромът на Churg-Strauss. Основното имунологично изследване е наличие и серумни нива на ANCA. Честотата и резултатите от изследването се показани на табл. 12.

Таблица 12. Честота на основните видове ANCA при ANCA асоциираните васкулити

ANCA	Основен антиген	ANCA асоциирани васкулити	Честота
cANCA	Протеиназа 3 (PR3)	Грануломатоза на Wegener Микроскопичен полиангиит Синдром на Churg-Strauss	75% 40% 10%
pANCA	Миелопероксидаза (MPO)	Синдром на Churg-Strauss Микроскопичен полиангиит Грануломатоза на Wegener	40% 50% 20%
Отрицателни	-	Синдром на Churg-Strauss Микроскопичен полиангиит Грануломатоза на Wegener	50% 10% 5%

Описват се различни флуоресцентни образи (pANCA, атипични pANCA, cANCA, xANCA) с различни клинични асоциации. cANCA най-често се асоциират с грануломатоза на Wegener, микроскопски полиангиит и Churg-Strauss синдром. pANCA първоначално са описани при микроскопичен полиангиит и Churg-Strauss синдром, но се наблюдават

и при други видове васкулити, свързани с възпалителни чревни заболявания (IBD), СЛЕ, РА, ювенилен артрит и др. Антигенните епитопи на ANCA, важни за откриване на васкулити, са Pr3 и MPO. Антипротеиназа 3 са с висока специфичност за грануломатоза на Wegener, докато антимиелопероксидаза са с висока специфичност за микроскопичен полиангиит и в по-малка степен за синдром на Churg-Strauss. Наред със споменатите автоантитела значение имат и антитела, насочени срещу LAMP-2, миозин и плазминоген.

7. Антифосфолипиден синдром

Антифосфолипидният синдром (АФС) е имуномедирана васкулопатия, протичаща с рекурентни съдови тромбози, спонтанни аборти и тромбоцитопения, и асоциирани с постоянно повишени нива на антифосфолипидни антитела и техни белтъчни кофактори. Наред с класическата описана триада се наблюдават и засягания на ЦНС, кожата и др.

АФС може да е първично заболяване или в рамките на друго аутоимунно заболяване, най-често системен лупус еритематозес. От групата антифосфолипидни антитела рутинно в имунологичната диагностика се използват антикардиолипинови антитела, антитела срещу $\beta 2\text{GPI}$, антитела срещу протромбин и лупусните антикоагуланти. Важно е да се отбележи, че повишен титър на антикардиолипинови антитела може да се установи не само при АФС, но и при редица инфекции.

При репродуктивни неуспехи в рамките на първичен АФС в съображение влиза и изследване на антитела срещу фосфатидилсерин и анексин V.

8. Спондилоартропатии

Серонегативните спондилоартропатии са хронични възпалителни заболявания, често ангажиращи сакроилиачните стави, гръбначния стълб и по-рядко периферните стави. Възпалението обхваща инсерциите на сухожилията и лигаментите на костта. Ентезитът е ключова характеристика. Към тази група принадлежат анкилозиращият спондилит, псориатичният артрит, синдромът на Reiter и артритът, асоцииран с интестинални чревни заболявания (IBD). Имунологичните изследвания по правило показват отсъствие в серума на ANA, ревмафактори или антитела срещу циклични цитрулинирани пептиди. За сметка на това спондилоартропатиите имат подчертана асоциация с генетичния маркер от HLA системата – HLA-B27, чието изследване може да подпомогне диагнозата.

С. ДИАГНОСТИЧНИ ИМУНОЛОГИЧНИ ПОДХОДИ ПРИ ОРГАН-СПЕЦИФИЧНИ АВТОИМУННИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

1. Аутоимунен гастрит и пернициозна анемия

Аутоимунният гастрит е хронично възпалително заболяване на стомаха, асоциирано с антитела към париеталните клетки и интринзич-фактора (IF). При недостиг на витамин B12 вследствие на

нарушената му резорбция, поради антитела срещу IF, се развиват пернициозна анемия и неврологични симптоми.

Изследването на автоантитела срещу стомашни париетални клетки показва, че 60-90% от пациентите с пернициозна анемия имат антипариеталоклетъчни антитела, но този тест е с ниска специфичност, защото такива антитела се откриват както при всеки атрофичен гастрит (60%), така и при заболявания на други органи, напр. щитовидна жлеза. Антителата срещу IF са по-малко чувствителни (50-70%), но са много по-специфични за заболяването.

2. Цьолиакия

Цьолиакията или глютеновата ентеропатия е хронично аутоимунно заболяване на тънкото черво, което се наблюдава у генетично предразположени лица (HLA хаплотипове DQ2 и DQ8).

Базисното изследване, което се провежда при съмнение за цьолиакия, е установяване на анти-tTG и/или антиендомизиумни антитела клас IgA. Тестът анти-tTG е с висока диагностична чувствителност (над 90%) и специфичност (над 95%). Той се провежда, преди пациентът да е започнал безглютенена диета. В противен случай резултатът може да е фалшиво отрицателен. Тестът може да бъде фалшиво отрицателен и при пациенти с дефицит на IgA, поради което трябва да се изследва и нивото на IgA.

Нова генерация серологични тестове, използващи глиадинов или синтетичен деамидиран глиадин (анти-DGP-IgG), навлизат в практиката, но не се знае дали ще са по-информативни от сега използваните. Предимството на анти-DGP IgG е, че може да се използва като тест на пръв избор и при лица с неизвестен IgA дефицит. Наред със споменатите антитела се изследват и антиглиадинови от клас IgA, които при деца имат добра чувствителност. Наличието и величината на серумните серологични тестове се повлияват много ефективно от безглютеновата диета и това корелира много добре с подобряването на морфологичните чревни промени.

HLA-DQ2/DQ8 типизирането има важна роля в диагностиката на цьолиакията, тъй като не се влияе от включването на безглютенена диета; HLA-DQ2 е положителен в 95% от случаите, а HLA-DQ8 – в останалите 5%. С извършване на HLA-DQ2/DQ8 типизиране по клинична преценка при деца и юноши може да се избегне чревната биопсия (ESPGHAN 2012). Трябва да се има предвид, че положителните генетични тестове не означават цьолиакия, а само предиспозиция, докато отрицателните практически изключват тази диагноза.

3. Възпалителни чревни заболявания (IBD)

Представяват хронични възпалителни заболявания с неясна етиология, ангажиращи стомашно-чревния тракт, понякога и с екстраинтестинални изяви (ставни, очни, кожни засягания). Основните представители, включени в тази група, са болест на Крон и улцерозен колит

Имунологичните изследвания, които биха могли да подпомогнат диагнозата и проследяването, са изследване на фекалните маркери на възпалението – калпротектин и лактоферин. Наред с това серумните изследвания включват ANCA (образът е на pANCA или атипични pANCA и тези антитела са по-типични за улцерозния колит) и антителата срещу *Saccharomyces cerevisiae* – ASCA (по типични при болест на Крон). Други описани антитела, насочени срещу различни бактериални микроорганизми, са анти-OmpC (*Escherichia coli*), анти-I2 (*Pseudomonas*), анти-CBrl (*Clostridium*) и др. Тези антитела все още се нуждаят от потвърждение за своята диагностична полезност и отстъпват на ASCA по чувствителност и специфичност.

4. Хроничен аутоимунен хепатит

Аутоимунният хепатит (АИХ) е хронично, прогресиращо, възпалително чернодробно заболяване. Характерните му особености са флукуиращ ход на заболяването, интерфейс хепатит при хистологичното изследване, хипергаммаглобулинемия на IgG и наличието на специфични автоантитела.

Автоантителата се най-важните серологични имунологични показатели при АИХ (табл. 13), макар че почти липсват данни, които да показват ролята им в патогенезата на заболяването. Най-чест е кла-

Таблица 13. Типични автоантитела при различни форми на автоимунен хепатит

Тип	Автоантитела
АИХ – тип I “Класически”	Антинуклеарни Антигладкомускулни Антиактинови ANCA
АИХ – тип II	Анти-LKM-1 (<i>cytochrome P4502D6</i>) Анти-liver cytosol-1 (LC-1)
АИХ – тип III	Анти-SLA/ LP
Overlap синдром	Антимитохондриални Антинуклеарни Антигладкомускулни Антикарбон анхидраза II

сическият тип АИХ тип I. Той се асоциира с наличието на ANA и/или антигладкомускулни антитела (АГМА), които реагират с F-actin. Специфичността на АГМА за диагнозата АИХ е добра, а чувствителността им стига до 90%. По-рядко се установяват анти-двДНК антитела, както и атипични рANCA. Тип II АИХ се характеризира с антитела срещу LKM и/или LC-1. Най-специфични за АИХ тип III са анти-SLA/LP и те не се срещат при други чернодробни болести. АИХ може да се припокрива с първична билиарна цироза, както и с автоимунни холангити.

5. Първична билиарна цироза

Първичната билиарна цироза (ПБЦ) е хронично, холестатично чернодробно заболяване, което засяга предимно жени на средна възраст. При наличие на не особено характерната и често липсваща клинична симптоматика главен белег за ПБЦ е установяването на АМА в серума, дефинирани като анти-M2. Те реагират със субединици на 2 оксоиселия дехидрогеназен комплекс (2-OADC) и в повечето случаи разпознават E2 субединицата на пируват дехидрогеназата (PDH-E2). АМА/анти-M2 позитивните индивиди, дори когато нямат белези за холестаза и/или възпаление в черния дроб, е твърде вероятно да развият ПБЦ. АМА реагират и с антигени от външната митохондриална мембрана (анти-M4, анти-M8) и тези антитела показват корелация със сравнително активен ход на заболяването.

АМА се откриват при около 95% от пациентите с ПБЦ. От останалите 5%, 2,5% имат специфични ANA за ПБЦ – антитела срещу нуклеарни точки (sp100), ядрената мембрана (gp210) или центромерите (табл. 14). Болестнотипичните ANA (multiple dot pattern) се срещат при около 25% от АМА положителните и при над 70% от АМА отрицателните болни с ПБЦ, с което се увеличава процентът на ПБЦ, потвърдени с автоантитела. Има данни, че наличието на тези специфични за ПБЦ ANA корелират с различните типове на прогресия на заболяването. Например наличието на положителни анти-gp210 самостоятелно или в комбинация с анти-Sp100 е показателно за по-бърза прогресия към чернодробна недостатъчност. Само анти-Sp100 антитела се наблюдават при 10-15% от пациентите с ПБЦ и основно се асоциират със Sicca синдром. Асоциирането на АМА с хомогенни ANA, антитела срещу актин или срещу разтворимия чернодробен антиген (SLA/LP) е показател за припокриване на ПБЦ с автоимунен хепатит, особено ако има и увеличение на серумни IgG.

Голямо предимство на диагностичните имунологични тестове за АМА, анти-M2 и ПБЦ специфичните ANA е, че те имат много добри диагностична специфичност (~100%) и чувствителност (~95%) за ПБЦ. Наред със споменатото при ПБЦ се установява увеличение на общия серумен IgM.

Таблица 14. Автоантитела при ПБЦ

Автоантитела	Автоантигени
АМА-M2	M2 антиген е главният компонент (74 kDa) на E2 компонента на пируватдехидрогеназния комплекс
M2-3E (BPO)	Фузионен протеин от имуногенния домейн на E2 субединицата на триензимния комплекс (3E), представляващ главния автоантиген на M2 антигена (BPO, branched chain 2-oxo-acid dehydrogenase complex)
Sp 100	Нуклеарен антиген (100 kDa) е съставна част на NB (nuclear body), представящ се с характерна „multiple dot”, флуоресцентен образ на ANA- ИИФ изследване на Hep2 (MND)
PML	Промиелоцитен левкемичен протеин (PML) е съставна част на NB и също е таргетен антиген на MND ANA
gp 210	Нуклеопорин GP 210 е трансмембранен гликопротеин, който чрез ИИФ върху Hep2 клетки се визуализира като мембранен “rim pattern” образ на ANA

6. Автоимунни тиреоидни болести

Автоимунните тиреоидни болести (автоимунни тиреоидити) са най-честите орган-специфични заболявания, при които в резултат на автоимунен, възпалително инфилтративен и/или деструктивен процес се уврежда функцията на щитовидната жлеза.

Понастоящем установяването на автоантителата към тиреоидна пероксидаза (ТПО антитела), тиреоглобулин (ТАТ) и рецептора за TSH (TRAb) като специфични тиреоидни антигени са безпорни показатели за доказване на тиреоиден автоимунитет. Позитивирането на антителата предхожда тиреоидното заболяване. Биологичният ефект на ТАТ не е напълно изяснен и понастоящем те имат предимно диагностична стойност. Определянето на ТАТ има значение:

- За поставяне на диагнозата автоимунно тиреоидно заболяване, задължително в комбинация с ТПО антитела
- За проследяване при консервативно лечение на болестта на Graves, задължително в комбинация с ТПО антитела
- За оценка на риска от изява на тиреоидно автоимунно заболяване, особено при повишен ТСХ
- ТАТ трябва да се търсят при всички пациенти с диференциран тиреоиден карцином при изследване на тиреоглобулина (Tg) като туморен маркер, поради това че ниско позитивни ТАТ могат да интерферира с Tg, в резултат на което може да има фалшиво нисък или висок резултат за Tg.

Определянето на антителата срещу ТПО има значение за:

- Поставяне на диагнозата и оценка на риск от развитие на заболяването
- Оценка на риск от автоимунен тиреоидит при лечение с α -интерферон, IL-2, литий, амиодарон
- Оценка на риск от автоимунен тиреоидит при синдрома на Down
- Оценка на риск от тиреоидна дисфункция през бременността и постпартален тиреоидит
- Оценка на риск от аборт и неуспех на *in vitro* фертилизация.

Важно е да се отбележи, че в области без йоден дефицит не е икономически ефективно да се измерва ТАТ и ТПО едновременно, защото при ТПО отрицателни пациенти наличието на ТАТ позитивност рядко води до тиреоидна дисфункция. В райони с йоден дефицит трябва да се измерва ТАТ поради увеличаване на шанса да се улови тиреоидно автоимунно заболяване, особено при нодозни струми.

Освен диагностична стойност за болестта на Graves TRAb имат и прогностична стойност, защото имунологичната ремисия е успоредна на клиничната, както и рецидивите. Освен това всички тиреоидни автоантитела са и маркери за риск от заболяване, защото се установяват в кръвта преди клиничната симптоматика. TRAb преминават през плацентата като IgG антитела и може да предизвикат транзиторна тиреоидна дисфункция на новороденото, което налага изследването им във втори-трети триместър на бременността на майката с тиреотоксикоза и след раждането на детето. Позитивирането на TRAb носи риск от изява на тиреоид асоциирана офталмопатия (ТАО) и е неблагоприятен показател за прилагане на радиоiodлечение.

7. Захарен диабет тип 1

Автоимунният захарен диабет тип 1 (АЗД-1) най-често е полигенно, орган-специфично заболяване, при което поради клетъчно медирана автоимунна реакция е налице деструкция на бета-клетките на панкреаса, секретиращи инсулин, и последваща изява на захарен диабет. За диагностика и проследяване на заболяването се изследват антиинсулинови антитела (IAA), които се намират в над 50% от новодиагностицираните деца, като честотата им е свързана с възрастта. Диагностичната им чувствителност е най-висока при деца до 5-годишна възраст (90-100%). При деца след 12-годишна възраст се установяват в около 40%, а при възрастни (автоимунен диабет тип LADA) твърде рядко. IAA са намерени в серума на деца под 1-годишна възраст и концентрацията им спада постепенно с напредване на заболяването. Трябва да се изследват преди започване на инсулиновото лечение поради възможния имунизационен ефект на екзогенния инсулин, което е причина за трудното им проследяване. Друг тип използвани антитела в диагностичния процес са автоантителата към 65 kDa изоформата на глутамат декарбоксилазата (GAD65). GAD65 автоантитела се установяват при 70-80% от новозаболените от захарен диабет тип 1, в около 40% при автоимунен диабет тип LADA и в около 5-10% при гестационен захарен диабет. Те не са свързани с възрастта при изява на диабета, не търпят особена динамика в хода на заболяването, по-често се намират при женския пол, не се влияят от инсулиново лечение.

Анти-IA2/IA2 β автоантителата се установяват при новодиагностициран захарен диабет, съответно IA2 антитела при 55-75% и анти IA2 β – при 35-50% от случаите. Честотата им, подобно на GAD65 автоантителата, показва връзка с възрастта на изява на заболяването.

Антителата към цинковия транспортер (анти-ZnT8) се установяват в серума на около 50% от новодиагностицираните диабетици, предиабетици и първостепенни родственици на диабетици. Те се доказват обикновено след 3-годишна възраст, като честотата им прогресивно расте с възрастта на изява на заболяването и достига до 80% от болелите на 16-18 г., след което намалява.

Диагностичната и прогностична стойност на антителата при АЗД-1 са обект на обширен анализ. Данните показват, че ZnT8A и IA-2A автоантителата се появяват след 2-3-годишна възраст и честотата им плавно расте с възрастта. За разлика от тях GAD65 и IAA се появяват по-рано, нарастват до двегодишна възраст и оформят плато в динамиката на честотата след това, като IAA прогресивно намаляват след 5-годишна възраст. Индивидуалната прогностична стойност е свързана с броя позитивни автоантитела – при едно антитяло в серума, независимо от антигена, рискът от заболяване е до 25% за период на проследяване 15 години, при две позитивни антитела – до 70%, и при три и четири антитела – до 100%. Следователно за диагностичната практика и оценката на риска с цел профилактика е от изключителна важност да се изследва панел от антитела, който гарантира максимална чувствителност и специфичност. В серума на изследваните лица често има смес от различни автоантитела. Анализът само на едно от тях крие голям риск от фалшиво негативен резултат или обратното – позитивен, но несвързан с морбидност.

8. Миастения гравис (МГ)

Миастения гравис е хронично автоимунно невромускулно заболяване, характеризиращо се с различна степен на слабост на скелетните мускули на организма. Основен диагностичен момент е изследването на антитела срещу ацетил-холиновия рецептор (анти-AХ-R). Тестът е с висока чувствителност, като антитела се установяват при повече от 85% от пациентите с генерализирана МГ и при около 50% при пациенти с очна форма на миастения. Специфичността на изследването доближава 100%. Концентрацията на антителата варира между пациенти със сходна симптоматика, поради което не може да служи като белег, предсказващ тежестта на заболяването. В началото на болестта пациентите могат да са негативни по отношение на АХ-R антителата. Свързващи АХ-R антитела понякога са повишени и при пациенти със СЛЕ, възпалителна невропатия, РА и при здрави роднини на пациенти с МГ. Фалшиво положителни тестове се отчитат, когато кръвта е взета в рамките на 48 часа след хирургична процедура, която включва използването на обща анестезия и миорелаксанти. Като цяло, повишена концентрация на АХ-R-свързващи антитела при пациенти с клинични признаци, потвърждава диагнозата на МГ, но нормални концентрации на антитялото не изключват диагнозата.

Отрицателните серуми за анти-AХ-R от болни с клинични белези за МГ следва да се тестват за *анти-MuSK* антитела. Антитела към мускул-специфичния рецептор тирозинкиназа (MuSK) са намерени в до 50% от пациенти с МГ, които са серонегативни за АХ-R антитела. При пациенти с тимом (около 15% от болните с МГ) в около 75-80% се наблюдават и антитела срещу антигени на напречноабраздената мускулатура (титин, миозин, актин и рианодин-рецептор). Откриването им при болни с ранно начало на МГ повдига въпроса за наличен тимом. Тези антитела се срещат и в приблизително 30% от пациентите без тимом.

9. Синдром на Guillain-Barre

Представлява остра автоимунна периферна невропатия, предизвикваща слабост на крайниците, която прогресира за период от дни до четири седмици. Автоантитела, за които е установена роля, са представени в табл. 15.

Таблица 17. Паранеопластични автоантитела при неврологични синдроми

Антитяло	Синдром	Най-чести тумори
Anti-Hu (ANNA-1)	Енцефаломиелит, сензорна невропатия	дребноклетъчен белодробен рак, невробластом
Anti-Ri (ANNA-2)	Опсоклонус миоклонус синдром	млечна жлеза, дребноклетъчен белодробен
Anti-Yo (PCA-1)	Церебеларна дегенерация	яйчник, млечна жлеза, матка
Anti-PNMA2 (Ma2/Ta)	Ромбенцефалит. Лимбичен енцефалит	тестис
Anti-Tr (DNER)	Церебеларна дегенерация	Ходжкин
Anti-amphiphysin	Stiff person syndrome	млечна жлеза, дребноклетъчен белодробен рак
Anti-CV-2	Лимбичен енцефалит	дребноклетъчен белодробен рак, тимом
Anti-Sox-1	Церебеларна дегенерация Сензорна невропатия Ламбърт-Етън миастеничен синдром	дребноклетъчен белодробен рак
Anti-ZIC4	Церебеларна дегенерация	дребноклетъчен белодробен рак
Anti-recoverin	Ретинопатии	дребноклетъчен белодробен рак
Anti-GAD 65	Stiff person syndrome	млечна жлеза, дребноклетъчен белодробен рак, дебелочревен рак
NMDAR	Лимбичен енцефалит	овариален тератом
AMPA	Лимбичен енцефалит	дребноклетъчен белодробен карцином, млечна жлеза, тимом
GAMAbR	Лимбичен енцефалит	дребноклетъчен белодробен карцином

Таблица 15. Автоантитела при синдром на Guillain-Barre

Клинична проява	Антиганглиозидни антитела	Честота
Остра моторно-аксонална невропатия	GM1	64%
	GM1b	66%
	GD1a	45%
	GalNac-GD1a	33%
Остра моторно-сензорна аксонална невропатия	GM1	-
	GM1b	-
	GM1a	-
Синдром на Милер-Фишер	GQ1b	90%

Описаните автоантитела се изследват рядко и те не участват като критерии, потвърждаващи заболяването. Отсъствието на антитела не изключва диагнозата синдром на Guillain-Barre.

10. Автоимунен енцефалит

В миналото автоимунните енцефалити се свеждаха предимно до паранеопластичния лимбичен енцефалит – неврологични и психиатрични симптоми, асоциирани с тумори (предимно дребноклетъчен белодробен карцином). През последните години откриването на множество автоантитела срещу невронални антигени доведе до идентифицирането на различни типове лимбичен енцефалит, както и на други енцефалитни симптоми. Установени са голям брой автоантитела, насочени срещу множество антигени (табл. 16) с роля в патогенезата на заболяването, като част от тези автоантитела се изследват и в рамките на диагностичния процес.

Таблица 16. Автоантитела, насочени срещу различни видове антигени при автоимунните енцефалити

Интрацелуларни антигени	Антигени, локализирани на клетъчната мембрана	Екстрацелуларни антигени
Към ядрото на неврона: ANNA1(Hu), ANNA2 (Ri), ANNA3	Йонотропни канали и рецептори AChR, NMDAR (NR1, NR2), AMPAR (GluR1, GluR2), калциеви канали, GlyR-α1	Синаптични протеини: LGI1
Към цитоплазмата на неврони и мускулни клетки: Yo(PCA1), Tr, PCA2, Ta(Ma2), Ma1, Zica, Gephyrin, CARP8, ENO1, titin, GAD, Amphiphysin	Метаботропни канали и рецептори D1, D2, GABABR1, mGluR1, mGluR5	
Към гlijата: CV-2, Bergman (Sox-1), ENO1	Други мембранни структури AQP4, MuSK, CASPR2, миелинов олигодендроцитен протеин (MOG), ганглиозиди (GN1, ENO1)	

Част от автоантителата са асоциирани с тумори, което дава възможност за ранната диагностика на злокачественото заболяване, но друга част остават с неизяснен произход (табл. 17).

При пациенти с лимбичен енцефалит и наличие на онконеврални антитела не се налага повторното им изследване, тъй като нивата им не корелират с клиничното развитие. За разлика от това, антителата срещу повърхностните невронални антигени намаляват титъра си успоредно с клиничното възстановяване, като ниски нива могат да персистират с години.

Антителата срещу повърхностни невронални антигени (NMDAR, GABAR, AMPAR, LGI1) се установяват чрез имунофлуоресценция на специфичен субстрат (HEK293 клетки). При пациенти с NMDAR антитела, те могат да се срещнат в цереброспиналната течност, дори да липсват в серума, обратно на LGI1 антитела при непаранеопластичен енцефалит, където антителата се намират в серума, но липсват в цереброспиналната течност.

Наличните антитела дават и една от класификациите на автоимунните енцефалити:

- | | |
|--------------------------|-----------------------------------|
| • Anti-NMDAR енцефалит: | • Anti-Aqp4 енцефалит |
| • Anti-AMPA енцефалит | • Anti-MOG енцефалит |
| • Anti-LGI1 енцефалит | • Anti-GAD енцефалит |
| • Anti-GABA bR енцефалит | • Anti-GlyR α 1 енцефалит. |

3. Правила за добра лабораторна имунологична диагностика и мониториране в хематологията

А. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КЛОНАЛНОСТ ПРИ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНИ ПРОЦЕСИ ЧРЕЗ АНАЛИЗ НА МОНОКЛОНАЛНИ ПРОТЕИНИ И/ИЛИ КЛОНАЛНИ ПРЕНАРЕЖДЕНИЯ

Структурата по клинична имунология трябва да е в състояние: 1) да установи наличието, да определи количеството и да идентифицира типа на моноклонални протеини: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, капа- и ламбда-свободни леки вериги в серум, урина и ликвор чрез имунна електрофореза и/или количествено определяне на свободни леки вериги в серума. При установено наличие на моноклонални протеини се провежда имунофиксационна електрофореза за определяне на типа им; 2) да определи количеството на свободни капа- и ламбда-леки вериги в серум, както и съотношението капа/ламбда чрез нефелометрия или турбидиметрия; 3) да определи количествено тежки вериги и съотношение в серум чрез турбидиметрия; 4) да определи наличието на капа- и ламбда-лековерижна иРНК в плазмотити чрез хибридизационни методи; 5) да изследва клонални пренареждания на гените на имуноглобулинови вериги и/или Т-клетъчни рецептори чрез утвърдени за това амплифициращи *методи*: верижна полимеразна реакция (PCR), мултиплексна PCR, PCR в реално време (RT-PCR).

1. Установяване на наличието, определяне на количеството и идентифициране на типа на моноклонални протеини: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, капа (κ)- и ламбда (λ)-леки вериги в серум, урина и ликвор се осъществява в имунологична лаборатория за целите на диагностиката при съмнение за моноклонална гамапатия, както и за оценка на терапевтичния отговор в хода на лечението на плазмоклетъчни неоплазии и при проследяване по време на ремисия. Наличието на моноклонални протеини се установява чрез имунна електрофореза. При установени моноклонални протеини се провежда имунофиксационна електрофореза за определяне на типа им. При всяка реакция се използва сертифициран контролен материал от нормален сборен човешки серум и сборен човешки серум с високо съдържание на гама-глобулини.

2. Определяне на количеството на свободни капа- и ламбда-леки вериги в серум, урина и ликвор, както и съотношението капа/ламбда се осъществява в имунологична лаборатория за целите на диагностиката при съмнение за моноклонална гамапатия независимо от резултата на имунната електроф-

ореза, както и за оценка на терапевтичния отговор в хода на лечението на плазмоклетъчни неоплазии и при проследяване по време на ремисия. Количеството на свободни капа- и ламбда-леки вериги, както и на съотношението капа/ламбда се определя чрез нефелометрия или турбидиметрия. При всяка реакция се използва сертифициран контролен материал от сборен човешки серум с нормално и високо съдържание на свободни леки вериги.

3. Идентифициране на двойки тежки/леки имуноглобулинови вериги в серум: $IgG\kappa$ и $IgG\lambda$, $IgA\kappa$ и $IgA\lambda$, $IgM\kappa$ и $IgM\lambda$, като се определя съотношението в съответната двойка, се осъществява в имунологична лаборатория за целите на диагностиката с цел специфично количествено определяне на имуноглобулина, ангажиран в неопластичния процес при диагностицирани пациенти с плазмоклетъчен миелом с ниски нива на моноклонални имуноглобулини (< 10 g/l), както и за проследяване на нивата на ангажираните моноклонални имуноглобулини и степента на имунопареза в хода на лечението на плазмоклетъчни неоплазии и при проследяване по време на ремисия. Количеството на двойки тежки/леки имуноглобулинови вериги се определя чрез нефелометрия/турбидиметрия. При всяка реакция се използва сертифициран контролен материал от сборен човешки серум с нормално и високо съдържание на свободни леки вериги.



Фигура 8. Алгоритъм на изследванията за моноклонален протеин

4. Изследване на клонални пренареждания на гените на тежки имуноглобулинови вериги (IgH) и Т-клетъчни рецептори (TCR) може да се осъществява в имунологична лаборатория. По този начин се предоставят молекулярни доказателства за клоналност при суспектни лимфопролиферативни нарушения и отграничаване от поликлонални реактивни състояния, установява се евентуална клонална връзка между процеси с различна локализация и/или между проба към диагноза и при рецидив, прилага се за изследване на минимална (измерима) резидуална болест при злокачествени лимфопролиферативни заболявания. Изследването на клонални пренареждания на гените на тежки имуноглобулинови вериги (IgH) и Т-клетъчни рецептори (TCR) може да се осъществи чрез ензимна рестрикция, последвана от гел електрофореза и Southern блотиране, като се използват сонди за известните TCR гени; PCR базирани методи или NGS. Препоръчва се при всяко тестване на клоналност да се включат контроли: моноклонални клетъчни линии и/или проби, показващи типичен поликлонален модел на Ig/TCR продукти с хетерогенно разпределение на размера на CDR3, като напр. моноклеарни клетки от периферна кръв или тонзиларни клетки. Молекулярните данни задължително се интерпретират в съпоставка с данни от (хемато)-патология и за предпочитане също с резултати от флоуцитометрично имунофенотипизиране.

Б. ИМУНОФЕНОТИПИЗАЦИЯ НА ХЕМАТОЛОГИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

1. Флоуцитометрично имунофенотипизиране на левкемии

Левкемиите представляват злокачествени заболявания, характеризиращи се с клонална експанзия на хемопоеични прекурсори с нарушена диференциация и съзряване, в резултат на което е нарушена нормалната функция на кръвните клетъчни елементи. В зависимост от нивото на малигнена трансформация и засегнатата хемопоеична линия левкемиите могат да имат фенотип на миелоидна, моноцитна, лимфоидна (В- и Т-клетъчна), промиелоцитна еритроидна, мегакариобластна, прекурсорна плазматично-дендритноклетъчна диференциация или недиференциран или смесеноклетъчен фенотип.

За флоуцитометрично имунофенотипизиране на остри левкемии се препоръчва изследване на костномозъчен аспират. Изследването на периферна кръв дава съпоставими резултати при наличие на бласти $> 30.10^9/l$ или над 80%, както и представлява алтернатива в случаите със суха пункция (dry tap) (поради костномозъчна фиброза или друга причина). Не се налага успоредно изследване на костен мозък и периферна кръв, освен при конкретни индикации по изключение. Във всички възможни случаи изследването трябва да бъде осъществено преди провеждане на лечение, което включва цитостатици, колониостимулиращи фактори, интерферон, кортикостероиди. За имунофенотипизация чрез флоуцитометрия по изключение могат да бъдат използвани материали от ликвор, малигнени изливи, свеж материал от лимфни възли или туморни формации след изготвяне на клетъчна суспензия.

Лабораторията трябва да има възможности за морфологично и цитохимично изследване. Лабораториите, които не могат да проведат морфологичен анализ, създават добре функциониращ механизъм за комуникация със звена, осъществяващи морфологична оценка на същия клиничен материал. Всяко несъответствие между данните от морфологичното и имунофенотипното изследване следва да бъде изяснено.

Имунофенотипизирането на левкемии с флоуцитометрия се провежда минимум с валидирана четирицветна имунофлуоресценция (6-параметърна флоуцитометрия). С използването на > 6 -параметърен анализ се увеличава възможността за идентифициране и характеризиране на абнормна популация в рамките на хетерогенната проба.

Диагностичните лаборатории, които осъществяват имунофенотипизация на левкемии, трябва да използват консенсусно приетите панели, вкл. панели за бърза ориентация и за анализ на оскъдни проби. Панелите трябва да съдържат утвърдени основни и допълнителни маркери, които да позволяват предоставянето на клинично значима информация, основана на линейната принадлежност, стадия на матuration арест и наличието на аберантни фенотипи на неопластичните популации. Не се препоръчва използване на ограничени комбинации от антитела, освен ако няма ограничения от страна на пробата

по отношение на количество и/или броя клетки или конкретно поставен клиничен въпрос. Панелите за имунофенотипизация на остри левкемии съдържат:

- Гейтиращи маркери. Необходимо е включването на поне един общ маркер във всички епруветки (препоръчително конюгиран с един и същ флуорохром), който позволява проследяване на анализираната популация, като това могат да бъдат антитела, насочени срещу линейно асоциирани антигени (CD19, cyCD3, CD56) или антигени, асоциирани с матурационен стадий (CD34, CD117). Когато технологичните възможности не позволяват това, то комбинацията CD45 vs SSC (side scatter) е задължителна за проследяване на отделните популации и оценка на качеството в поредните епруветки, флоуцитометрично „диференциално броене“ на изследваната проба и идентифициране на абнормната популация. Използването на FSC vs SSC не се препоръчва в онкохематологията.

- Задължителни маркери, които включват: а) Скриниращи цитоплазмени маркери за определяне на линейна принадлежност: cyCD3 за Т-клетъчна линия, cyCD79a за В-клетъчна линия, cyMyeloperoxidase за миелоидна линия; б) Линейно насочени антитела (не по-малко от две за линия) за потвърждаване на диагностичната насока: миелоидно асоциирани – CD33 и CD13; Т-клетъчно асоциирани – CD7 и CD2; В-клетъчно асоциирани – CD19 и CD22; в) Други задължителни маркери, асоциирани със: миелоидна матурация и диференциация – CD34, CD117, HLA-DR, CD14 (за отграничаване на моноцити и бласти), CD15 и/или CD65 (за идентифициране на гранулоцитна диференциация и оценка на хемодилуция на костномозъчните проби); идентифициране на определени субтипове ОМЛ – цитоплазмена или мембранна експресия на CD41 и/или CD61 (при мегакариобластни левкемии), CD235 (при еритролевкемии), CD36 (при еритролевкемии и моноцити), CD56 (при CD56+ CBF-ОМЛ), CD4 (при бластни неоплазии от прекурсори на дендритни клетки); дефиниране на бласти с В-клетъчна диференциация и определен стадий на матурация – CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, TdT, cyigm, smigm, kappa, lambda; дефиниране на бласти с Т-клетъчна диференциация и определен стадий на матурация – CD1a, CD2, smCD3, CD4, CD5, CD7, CD8, TCR-alfa/beta, TCR-gamma/delta. Включването на други допълнителни маркери не е задължително, но може да предостави важна информация за левкемичната популация.

Лабораторията следва да спазва определени принципи при разработването на панели за имунофенотипизация на левкемии. За изследване на антигени с висока експресия трябва да се използват слаби флуорохроми и обратно. Маркерите за идентифициране на отделни субпопулации трябва да се комбинират с линейно асоцииран маркер (например CD4 с CD3, CD10 със CD19 и т.н.). Маркери на ранни стадии на матурация се комбинират с късни (например CD15 със CD117 и/или CD34 и др.).

Резултатът от имунофенотипизация на левкемии съдържа следните специфични компоненти: поредност на изследването (към диагноза, проследяване) и диагностична хипотеза; клетъчен брой в изследвания материал; всички изследвани линейно асоциирани, матурационно асоциирани и други маркери, като се прецизира дали е изследвана мембранна и/или цитоплазмена експресия; характеристика на абнормната популация (напр. общо описание на базата на гейтиращата стратегия, количествена оценка на абнормната популация (представена като процент от общия клетъчен състав или CD45+ клетки и като абсолютен брой при изследване на периферна кръв), качествено описание на имунофенотипа (кои антигени са положителни и кои са отрицателни, абнормна реактивност от наблюдаваната върху нормални клетки, аберантно съчетаване на линейно асоциирани антигени и др.), коментар на разбираем език относно интензитета на флуоресценция за всеки маркер (нисък/среден/висок), описание на съпътстващите популации, маркиране на всяка необичайна или съществена находка, която би имала отношение към крайната диагноза). Диагностично заключение следва да бъде формулирано винаги когато е възможно и обосновано (напр. остра миелоидна левкемия с минимална диференциация, остра мегакариобластна левкемия и др.) или дефиниране на нозологична категория линейна принадлежност степен на матурация (напр. остра левкемия с миеломоноцитен фенотип; остра левкемия с миелоиден фенотип и белези на матурация и др.). Винаги когато е приложимо, да се определят антигените, подходящи за изследване на минимална резидуална болест. Препоръчителен компонент от резултата са препоръки и допълнителни коментари, като ясно бъде формулирана необходимостта от други изследвания

за окончателна диагноза и се упомене всяко несъответствие между флоуцитометричното изследване и предоставените клинични и/или морфологични данни, което следва да бъде изяснено.

2. Имунофенотипизация на зрели лимфоидни неоплазии (лимфоми)

Лимфомите представляват злокачествени заболявания в резултат на малигнена трансформация на имунни клетки (В/Т/НК клетки) в различна фаза на съзряване и диференциация, в резултат на което настъпва клонална експанзия с туморно разрастване на лимфна тъкан (лимфни възли, МАЛТ и др.), а в част от случаите – в костния мозък и/или периферната кръв.

За флоуцитометрично имунофенотипизиране на зрели лимфоидни неоплазии (лимфоми) се изследва материал от костен мозък и/или периферна кръв. За диагностициране на хронична лимфоцитна левкемия, LGL лимфопролиферации и синдром на Сезари по определение е необходимо изследване на периферна кръв. При вземане на материал от костен мозък за стадиране на болни с лимфоми е уместно отделяне на част от него за евентуално имунофенотипно изследване. Не се налага успоредно изследване на костен мозък и периферна кръв, освен при конкретни индикации, по изключение. Във всички възможни случаи, изследването трябва да бъде осъществено преди провеждане на лечение, което включва цитостатици, колониостимулиращи фактори, интерферон, кортикостероиди. По изключение могат да бъдат използвани материали от ликвор, малигнени изливи, свеж материал от лимфни възли или туморни формации след изготвяне на клетъчна суспензия.

Лабораторията трябва да има възможности за морфологично изследване. Лабораториите, които не могат да проведат морфологичен анализ, създават добре функциониращ механизъм за комуникация със звена, осъществяващи морфологична оценка на същия клиничен материал. Всяко несъответствие между данните от морфологичното и имунофенотипното изследване следва да бъде изяснено.

Имунофенотипизирането на зрели лимфоидни неоплазии (лимфоми) с флоуцитометрия се провежда минимум с валидирана трицветна имунофлуоресценция (5-параметърна флоуцитометрия). С използването на 6- до 10-параметърен анализ се увеличава възможността за идентифициране и характеризиране на абнормна популация в рамките на хетерогенната проба.

Диагностичните лаборатории, които осъществяват имунофенотипизация на зрели лимфоидни неоплазии (лимфоми), трябва да използват консенсусно приетите панели. Не се препоръчва използване на ограничени комбинации от антитела, освен ако няма ограничения от страна на пробата по отношение на количеството и/или броя клетки, или конкретно поставен клиничен въпрос. Панелите за имунофенотипизация на зрели лимфоидни неоплазии (лимфоми) съдържат:

- Гейтиращи маркери. Необходимо е включването на поне един общ линейно асоцииран маркер във всички епруветки (препоръчително конюгиран с един и същ флуорохром), който позволява проследяване на анализираната популация (CD19, CD3, CD56). Когато технологичните възможности не позволяват това, то комбинацията CD45 vs SSC (side scatter) е задължителна. Използването на FSC vs SSC не се препоръчва в онкохематологията.

- Задължителни маркери, които включват: а) *Скриниращи маркери за дефиниране на по-нататъшната стратегия на диагностичен анализ*: CD19 за В-клетъчните лимфоми, smCD3 за Т-клетъчните и CD56 за NK клетъчните пролиферации; *В-ориентираният панел* съдържа CD20, CD22, CD5, CD23, FMC7, CD10, CD103, CD25 и CD11c. Анализът на kappa- и lambda-леки вериги предоставя съществена информация за клоналния характер на зрялоклетъчната В-лимфоидна пролиферация; *Т/НК ориентираните панели* съдържат маркери за дефиниране на Т-клетъчната неопластична популация: CD2, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, TCR-alfa/beta, TCR-gamma/delta; както и за дефиниране на NK клетъчната неопластична популация: CD56.

Допълнителни незадължителни маркери могат да предоставят още информация в диференциалнодиагностичния процес, оценка на прогнозата или мониториране на неопластичната популация. При разработването на панели за имунофенотипизация на лимфоми лабораторията следва да спазва принципи, аналогични на формулираните при имунофенотипизация на левкемии.

Резултатът от имунофенотипизация на зрели лимфоидни неоплазии (лимфоми) съдържа диагностично заключение винаги когато е възможно и обосновано (напр. моноклонална В-клетъчна лим-

фоцитоза, хронична лимфоцитна левкемия, трихولةвкемия, синдром на Сезари) или дефиниране на нозологична категория линейна принадлежност и диференциалнодиагностични възможности (напр. зрялоклетъчен В-клетъчен лимфом по типа на мантелноклетъчен и т.н.)

3. Имунотипизация на плазмноклетъчни неоплазии

Плазмноклетъчните неоплазии са в резултат на малигнена трансформация на плазмоцити, вследствие на което настъпва клонална експанзия в костния мозък и/или в екстрамедуларни локализации и се характеризира с повишена продукция на моноклонален парапротеин.

За флоуцитометрично имунотипизиране на плазмноклетъчни неоплазии е необходимо изследване на костен мозък. По изключение, при клинични индикации за плазмноклетъчна левкемия е необходимо изследване на периферна кръв.

Лабораторията трябва да има възможности за морфологично изследване. Лабораториите, които не могат да проведат морфологичен анализ, създават добре функциониращ механизъм за комуникация със звена, осъществяващи морфологична оценка на същия клиничен материал.

Имунотипизирането на плазмноклетъчни неоплазии с флоуцитометрия се провежда минимум с валидирана четирицветна имунофлуоресценция (6-параметърна флоуцитометрия). С използването на > 6-параметърен анализ се увеличава възможността за идентифициране и характеризиране на абнормна популация в рамките на хетерогенната проба. Използването на 3-цветни комбинации: CD38/CD138/CD45; CD38/CD56/CD19; kappa/lambda/CD138 следва да бъде ограничено само до скрининг на изследваните проби за плазмноклетъчно съдържание, без да се формулира диагностична оценка относно наличие или липса на неоплазия.

Диагностичните лаборатории, които осъществяват имунотипизация на плазмноклетъчни неоплазии трябва да използват консенсусно приетите панели, които съдържат:

- Гейтиращи маркери. Всички епруветки следва да съдържат CD138 (vs SSC) за идентифициране на плазмноклетъчната популация (препоръчително конюгиран с един и същ флуорохром). Добавянето на CD38, CD19 и CD45 във всички епруветки прецизира диференцирания анализ на имунотипа на нормалната и неопластичната плазмноклетъчна популация. Гейтиращата стратегия, основана само на оценката на общия левкоцитен антиген CD45, не се препоръчва. Използването на FSC vs SSC не се препоръчва в онкохематологията.

- Задължителни маркери за: а) отграничаване и характеризиране на нормални/абнормни плазмноклетъци: CD20, CD56, CD117, CD27, CD28, CD81; б) дефиниране на клоналност чрез оценка на цитоплазмения експресия на kappa-/lambda-леки вериги.

При разработването на панели за имунотипизация на плазмноклетъчни неоплазии лабораторията следва да спазва принципи, аналогични на формулираните при имунотипизация на левкемии и лимфоми.

4. Имунотипизация за измерване на минималната (измерима) резидуална болест

Независимо от постигане на пълна ремисия, малигненият клон при злокачествени хематологични заболявания (левкемии, левкемизирани лимфоми, плазмноклетъчни неоплазии) не се отстранява напълно и оцеляват резидуални малигнени клетки, които остават недоловими, под разграничителната граница на рутинните морфологични методи (10^{-2}) – състояние, дефинирано като минимална резидуална болест. В хода на лечението, както и при проследяване по време на пълна ремисия се осъществява флоуцитометрично изследване на резидуални клетки чрез идентифициране на свързания с конкретната неоплазия антигенен профил на малигнената популация и отграничаване от нормалните клетъчни популации.

За измерване на минималната (измерима) резидуална болест при остри левкемии, плазмноклетъчни неоплазии и лимфоми с костномозъчно ангажиране е задължително изследване на костен мозък, а при хронична лимфоцитна левкемия е допустимо изследване на периферна кръв. Лабораторията трябва да има възможности за морфологично изследване. Лабораториите, които не могат да проведат морфологичен анализ, създават добре функциониращ механизъм за комуникация със звена, осъществяващи морфологична оценка на същия клиничен материал.

Необходим е разработен аналитичен подход, включващ серии от свързано гейтиране за най-добро определяне на резидуалната популация. Имунотипизирането на минималната (измерима) резидуална болест с флоуцитометрия се провежда минимум с валидирана осемцветна имунофлуоресценция

(10-параметърна флоуцитометрия). С използването на > 10-параметърен анализ се увеличава точността на измерване на резидуалната абнормна популация в рамките на хетерогенната проба. Анализът се осъществява върху 500 000 до 1 000 000 клетки с цел достигане на ниво на чувствителност 1:104 до 1:105.

Панелът за флоуцитометричен анализ на минималната (измерима) резидуална болест трябва да се конструира индивидуално за конкретния пациент спрямо установената към диагноза линейна принадлежност, матурационен стадий, аберантно експресирани маркери и асинхронно експресирани антигени:

- Гейтиращи маркери. Необходимо е включването на маркерите с установена аберантна експресия към диагноза (ако са намерени такива; препоръчително конюгирани със същия флуорохром), което би позволило проследяване на анализираната популация. Комбинацията CD45 vs SSC (side scatter) е задължителна за анализ на отделните популации и оценка на качеството на изследвания материал и идентифициране на абнормната популация. Използването на FSC vs SSC не се препоръчва за гейтиране в онкохематологията.

- Необходимо е включването на поне два линейно специфични маркера, което позволява точно определяне на анализираната популация (напр. CD19, суCD3, CD56, CD33). Препоръчва се включването на установени към диагнозата маркери, асоциирани с матурационен стадий (напр. CD34, CD117) и/или маркери с асинхронна експресия, установени към диагноза.

Резултатът от имунофенотипизация на минималната (измерима) резидуална болест съдържа следните специфични компоненти: диагноза и установен фенотип към диагноза; поредност на изследването (проследяване); клетъчен брой, върху който е осъществен анализът; оценка на качеството на изследвания материал (добро, задоволително, незадоволително); изследваните линейни, матурационни и аберантно експресирани маркери, като се прецизира дали е изследвана мембранна и/или цитоплазмена експресия; количество на измерваната малигнена популация, установена при изследването, изразено в процент от общия клетъчен състав, последвано от антигенния профил на резидуалната популация; количество на други популации с отношение към проследяването, възстановяването на нормалната хемопоеза и оценка на костномозъчния статус, изразено в процент от общия клетъчен състав.

5. Определяне на повърхностни гликозилфосфатидилинозитол свързващи молекули (в т.ч. CD55, CD59 и CD14) върху еритроцитна, гранулоцитна и моноцитна популация клетки от периферна кръв чрез флоуцитометрия

Клоналните популации от клетки на пароксизмалната нощна хемоглобинурия (PNH) се характеризират с дефицит на гликозилфосфатидилинозитол-свързващи протеини (GPI-AP) върху клетъчната повърхност поради придобита мутация на гена PIG-A в една или повече хемопоестични стволови клетки. Доскоро изследването за търсене на PNH клон се осъществяваше с Ham тест, който беше изместен от по-чувствителен и по-лесен флоуцитометричен анализ. В допълнение, 50% от пациентите с апластична анемия, както и част от пациентите с миелодиспластични синдроми имат PNH клон/ове, открити към момента на диагнозата.

Определянето на процента на експресия и съответно загуба на експресия на повърхностни гликозилфосфатидилинозитол-свързващи молекули се провежда със съответно валидирана минимум четирицветна имунофлуоресценция.

За определяне на дефицит в еритроцитната популация се използва гейтиране в логаритмична скала спрямо FSC/SSC осите и хистограмен анализ за измерване на дефицита в експресията на гликозилфосфатидилинозитол-свързващи молекули (CD55, CD59). Флоуцитометричният анализ на еритроцитите при нетрансфузирани пациенти трябва да е в състояние да разграничи тип III (пълнен антигенен дефицит), тип II (частичен антигенен дефицит; наличие на клонове на пароксизмалната нощна хемоглобинурия) и тип I (нормална антигенна експресия).

Флоуцитометричният анализ за определяне на дефицит на гликозилфосфатидилинозитол-свързващи молекули върху гранулоцитите (CD55, CD59) и моноцитите (CD55, CD59, CD14) е необходимо да се базира на успоредното гейтиране спрямо FSC/SSC и CD45/SSC осите в линейна скала. Флоуцитометричният анализ на гранулоцитите и моноцитите трябва да е в състояние да разграничи наличие на антигенен дефицит и нормална антигенна експресия. Всяка лаборатория може да използва допълнителни комбинации от линейно специфични моноклонални антитела за допълнително прецизиране на изследваните популации.

Определянето на повърхностни гликозилфосфатидилинозитол-свързващи молекули чрез флоуцитометрия изисква включване на здрава контрола при всеки изследван пациент за коректно поставяне на маркерите, определящи позитивна и негативна експресия.

6. Имунцитохимично и имунохистохимично изследване на интрануклеарни цитоплазматични мембранни антигени и/или генетични последователности.

Определянето на линейната принадлежност, ниво на съзряване и диференциация, клоналност и наличие на аберантна експресия при злокачествени хематологични заболявания и лимфопролиферативни процеси, отграничаване на реактивни от неопластични процеси, идентифициране на клетъчни субтипове, туморни маркери, фактори на средата, пролиферативна активност, имуноглобулини и леки вериги и др. може да се осъществи и чрез идентифициране и локализиране на интрануклеарни цитоплазматични мембранни антигени и/или генетични последователности в цитологични препарати от клетъчни суспензии и клетъчни линии или в тъканни срези чрез съответно имуноцитохимично имунохистохимично или хибридизационно маркиране и последваща визуализация посредством флуоресцентни бои или ензимни системи.

Препоръчва се лабораторията да има възможности за морфологично изследване или създаване на добре функциониращ механизъм за комуникация със звена, осъществяващи морфологична оценка на същия клиничен материал.

Резултатите съдържат информация за вида на положително и отрицателно оцветените клетки и структури, описание на типа на оцветяването (дифузно, фокално, цитоплазматично, ядрено, мембранно), а при необходимост и коментар на контролите и използваните антители/сонди.

В. Изследване на хемопоетични стволови клетки

Зрелите кръвни клетки имат ограничена продължителност на живота и трябва непрекъснато да се заменят през целия живот. Този процес се осигурява от пролиферацията и диференциацията на много малка популация от плурипотентни хемопоетични стволови клетки (HSCs), които притежават още едно основно качество – способността да се възстановят чрез самообновяване. HSCs се характеризират с определена имунофенотипна констелация, като CD34 е най-широко използваният маркер за идентифицирането и количественото им определяне. По време на диференциацията потомството на HSCs преминава през различни стадии на съзряване, като генерира мултипотентни и линейно комитирани клетки преди достигане на пълната си зрялост. Костният мозък е основното място на хемопоезата при хората и при нормални условия в периферната кръв могат да се открият само малък брой хемопоетични стволови и прогениторни клетки. Мобилизацията и колекцията на HSCs за целите на трансплантацията изискват осъществяване на изследвания за количествената им оценка в кръв/костен мозък и аферезен продукт.

Определянето на броя CD34⁺ хемопоетични стволови клетки с флоуцитометрия се провежда със съответно валидирана дву- или трицветна имунофлуоресценция.

Всяко двуцветно определяне на броя CD34⁺ хемопоетични стволови клетки чрез флоуцитометрия включва CD45 и CD34 антители. Определянето на броя CD34⁺ хемопоетични стволови клетки чрез флоуцитометрия не изисква включване на изотипна контрола. Всяка лаборатория може да използва допълнителни комбинации от моноклонални антители за изследване на други маркери (определяне на субпопулации) за нуждите на диагностично-лечебния процес. За определяне на броя CD34⁺ хемопоетични стволови клетки чрез флоуцитометрия се използват CD34⁺ антители само от клас II, конюгирани с фикоеритрин, или клас III, независимо от вида на конюгата. За определяне на броя CD34⁺ хемопоетични стволови клетки чрез флоуцитометрия се използват CD45 антители, които установяват не само всички изоформи, но и всички гликоформи на CD45 антигена. Анализът включва минимум 100 CD34⁺ положителни събития или не по-малко от 75 000 CD45(+) положителни събития във всяка епруветка. Осъществява се в две успоредно маркирани проби от един и същ клиничен материал и броят CD34⁺ хемопоетични стволови клетки се определя като средна стойност от двата резултата.

Определянето на броя CD34+ хемопоеични стволови клетки чрез флоуцитометрия изисква стратегия на последователно определяне на електронни прозорци за анализ: а) за анализ се използва CD45/SSC прозорец, базиран на слабо светеща CD45+ популация с нисък SSC; б) използва се CD34/SSC прозорец, базиран на силно светеща CD34+ популация с нисък SSC; в) използва се FSC/SSC прозорец, базиран на популация с нисък SSC и нисък, но не по-нисък от този на лимфоцитите FSC; г) определя се популация хемопоеични клетки със следните характеристики: нисък SSC и нисък FSC, но не по-нисък от този на лимфоцитите, силно светеща CD34+ и слабо светеща CD45+.

Резултатът се представя като процент CD34+ хемопоеични стволови клетки, определен на базата на броя CD34+ събития, отговарящи на горепосочените критерии, и броя CD45+ събития (и в двата случая представени като средни стойности от анализа на две успоредно маркирани проби).

Абсолютният брой на CD34+ хемопоеични стволови клетки може да се определя: а) индиректно на базата на абсолютния брой левкоцити, определен чрез хематологичен анализатор, и определения флоуцитометрично процент CD34+ хемопоеични стволови клетки; б) директно с използване на микрочастици.

Г. Флоуцитометрично изследване на клетъчен цикъл и/или количество ДНК

Изследването на ДНК е едно от първите приложения на флоуцитометрията. Принципът на анализа се основава на факта, че ДНК специфичните бои се свързват в стойхиометрично съотношение с клетъчната ДНК. В резултат количеството на свързаната боя, което може да се измери чрез флоуцитометрия, е пропорционално на съдържанието на ДНК в клетката.

Флоуцитометричното определяне на ДНК съдържанието се използва основно за оценка на пролиферацията на малигнените популации при неоплазии. Клинични проучвания на злокачествени заболявания използват количественото определяне на S-фазата на малигнената популация като показател за стратифициране на болните при оценка на общата преживяемост и ремисия. Флоуцитометричното измерване на съдържанието на ДНК може да намери клинично приложение при оценка на риска при някои хематологични заболявания (напр. високи стойности на ДНК индекса > 1.16 са свързани с по-благоприятна прогноза при ОЛЛ, а прогнозата се оценява като лоша при хиподиплоидия). Установяването на ДНК анеуплоидност и високи стойности на S-фазата се свързват с лоша прогноза при миелодиспластичните синдроми, а ДНК индексът е значим независим прогностичен фактор при мултиплиения миелом. Приложението на ДНК анализа при оценка на риска при ОМЛ и лимфоми е ограничено.

За флоуцитометричен ДНК анализ се използва клиничен материал от венозна кръв, костен мозък, телесни течности, ексцизионни или тънкоиглени аспирационни биопсии. Най-добри резултати се получават от свеж материал, но замразени или фиксирани тъкани също могат да бъдат използвани, особено при провеждане на ретроспективни проучвания. Материалът се обработва по начин, който осигурява получаването на суспензия от клетки или клетъчни ядра с възможно най-малко количество разрушени или слепнали помежду си клетки.

Съществува голямо разнообразие от бои, които се свързват в стойхиометрично съотношение с ДНК. Конкретният избор зависи от източника на флуоресценция. Най-широко разпространени в клиничната практика са флоуцитометри с аргонов лазер, излъчващ синя светлина с $\lambda = 488 \text{ nm}$, а най-широко използваният за маркиране на ДНК флуорохром е пропидиевият йодид (propidium iodide, PI). PI се свързва с двойноверижната ДНК и при преминаване през лазера излъчва червена флуоресценция. Следва да се има предвид, че боята маркира и двойноверижна РНК, поради което преди анализа изследваните проби трябва да се обработят с РНК-аза. Виталните клетки притежават свойството активно да изпомпват PI. За да се осигури достъп на боята до клетъчното ядро, е необходима предварителна фиксация на клетките и пермеабилзация на клетъчната мембрана. За ДНК анализ на витални клетки в практиката най-често се използва bis-benzimidazole, Hoechst 33342. При необходимост на източник на UV лъчи се използва 4'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), който специфично маркира ДНК, при което флуоресценцията му се засилва 200 пъти.

Особено важно е да се гарантира правилно съотношение на крайната концентрация на клетки в анализирания материал спрямо количеството на боята. Оптималната клетъчна концентрация е около

10⁶/ml. По отношение на най-честия ДНК маркер – PI, за маркиране на 10⁶ клетки се препоръчва използването на не по-малко от 20 µg.

При флуоцитометричния анализ се използва линейна скала. Калибрацията на инструмента подлежи на регулярен контрол и се оценява по критерии: а) прецизност, оценена според полученото CV на пика G0/G1 при измервания на стандартни сфери и/или фиксирани оцветени лимфоцити, което следва да бъде ≤ 3%; б) линейност, оценена като съотношение между средния канал на пика G2+M и средния канал на пика G0/G1, което следва да е между 1.95 и 2.05.

За измервания на ДНК съдържанието е необходима информация за не по-малко от 10 000 събития (маркирани клетки или клетъчни ядра).

ЛИТЕРАТУРА

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris N et al. (Eds): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th edition). IARC: Lyon 2017.
2. Porwit A, Béné MC (eds), Multiparameter flow cytometry in the diagnosis of hematologic malignancies Cambridge University Press, Cambridge, 2018.
3. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15:e538-e548.
4. De Haas V, Nofisat I, Ling Zh. Initial Diagnostic Workup of Acute Leukemia: ASCO Clinical Practice Guideline Endorsement Summary of the CAP and ASH Guideline. *Journal of Oncology Practice* 2019 15:2, 101-105.
5. Gerrit J. Schuurhuis et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018; 131(12): 1275-1291.

Г. ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ИН ВИТРО АЛЕРГЕН СПЕЦИФИЧНА АКТИВАЦИЯ/ДЕГРАНУЛАЦИЯ НА БАЗОФИЛИ

1. Лабораторията да е в състояние да определя *in vitro* алерген специфична активация/дегранулация на базофилни гранулоцити чрез флоуцитометрия.
2. Пациентите, тествани *in vitro*, не трябва да са приемали най-малко до 48 часа преди вземането на кръвната проба антиалергични лекарствени средства като антихистамини или да са преустановили преди два месеца приема на кортикостероиди.
3. На етапа стимулация на базофилите е недопустимо замърсяване на кръвните проби с въздушни алергени. *In vitro* активацията се извършва в чисти помещения и закрити боксове.
4. Всяко определяне на активация/дегранулация на базофили включва отрицателна и положителна контрола. Като положителна контрола се използва неспецифичен активатор (например хемотаксичен пептид fMLP).
5. Данните се събират през аналитичен прозорец за базофилната популация, експресираща високи нива на IgE.
6. Изброяват се най-малко 1000 базофила за проба или 50 000 до 100 000 левкоцита при анализ на клетките според параметъра големина (FSC).
7. Определя се процентът на дегранулираните базофилни гранулоцити според експресията на активационния антиген gr 53 (CD63) след анализ на съответните контроли за всеки отделен пациент – отрицателна и положителна.

4. Правила за добра медицинска практика в имунодиагностиката на инфекции и инфекциозни заболявания

А. ОБЩИ ПРАВИЛА

1. Най-често имунодиагностиката на инфекциите се базира на доказване на микробни антигени и специфични антитела. В повечето случаи се използва серум от пациента (отделен от кръв, взета с венепункция), но при някои инфекции се взема също и плазма (отделена с EDTA, хепарин или цитрат от кръв), както и ликвор, напр. при невроборелиоза. За определяне на специфични антитела срещу микробни антигени е препоръчително да се изследват две серумни проби: една – в началото на заболяването, и втора – 2-3 седмици по-късно.
2. Транспортирането на взетите проби от пациента до имунологичната лаборатория се съобразява с изискванията на валидираната процедура за използвания метод.
3. Съхранението на взетия за изследване материал е на +4-8°C, но не повече от 5 дни преди изследването; за по-дълго време пробата се замразява съгласно инструкциите на производителя, напр. на -20°C за 3 до 6 месеца.
4. Обикновено при инфекции се изследват два класа специфични имуноглобулини – IgM и IgG. Специфичните IgM маркират свежа инфекция, а IgG – напреднала, анамнестична или хронична.
5. Използват се утвърдени методи за детекция на показателите – имуноензимни (ELISA, имуноблот), хемилуминисцентни, електрохемилуминесцентни (ECLIA), флуориметрични и др.

В. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СПЕЦИФИЧНИ АНТИТЕЛА СРЕЩУ АНТИГЕНИ ПРИ БАКТЕРИАЛНИ ИНФЕКЦИИ

1. Лаймска борелиоза

Лаймската болест е кърлежо-предавана инфекция. Човек се заразява от ухапване на кърлеж. Основният подход за диагностика на заболяването включва определяне на специфични антитела срещу причинителя Борелия бургдорфери (*anti-Borrelia burgdorferi* антитела), насочени към VlsE, Fla,

OspC, OspA, OspB, BmpA и др. антигени. Изследват се два имуноглобулинови изотипа – *anti-Borrelia burgdorferi* IgM и IgG. Основният материал за изследване е серум или плазма, взети чрез венепункция; ликвор при съмнение за невроборелиоза. Показания за изследване на специфичните антиборелийни антитела са: ранни стадии на лаймска болест (IgM); напреднала форма на лаймска болест, вкл. невроборелиоза – изследват се и IgG; ухапване от кърлеж (след минимум 1 месец). Първа стъпка от изследването е скриниране – с ELISA или CLIA (хемилюминисцентен имуноен анализ); втора стъпка е потвърждаване с имуноблот за наличие и/или количество на специфичните антитела срещу VlsE, Fla, OspC, OspA, OspB, BmpA и др. IgM се откриват във високи титри около 25 дни след заразяването и могат да персистируют месеци или дори години. IgG се повишават бавно, но се задържат с месеци.

2. Полово предавани хламидиази

Гениталните хламидийни инфекции се проявяват при жените като уретрит, цервицит и салпингит, а при мъжете като уретрити и по-рядко като епидидимити и простатити. Новороденото може да се зарази от родовия канал на болна майка и да развие мукопурулентен конюнктивит няколко дни след раждането или пневмония. При генитални хламидиази се определят специфични антитела срещу Хламидия трахоматис (*anti-Chlamidia trachomatis* антитела) с имуноензимен, директен флуоресцентен тест или други утвърдени техники. Тук диагностично значение имат *anti-Chlamidia trachomatis* IgA и IgG, докато антихламидийните IgM в серума на новородено могат да бъдат индикация за пневмония при налични клинични данни. Показанията за изследване на антихламидийни антитела са: съмнение за урогенитална хламидийна инфекция, синдром на Райтер, тазова възпалителна болест. По-висока диагностична стойност от определянето на специфичните антихламидийни антитела имат PCR или клетъчната култура за доказване на самия причинител.

3. Атипична хламидийна пневмония

Определят се антитела срещу Хламидофила пневмоние (*anti-Chlamydophilla pneumoniae* антитела) от клас IgM, IgG, IgA при следните **показания**: данни за хламидийна или друга атипична пневмония (при остра фаза – IgM), неясно фебрилно състояние. При реинфекция се изследват IgG и IgA. При хронична инфекция IgA са по-добър маркер от IgG. Освен ELISA може да се приложи и MIF (микроимунофлуоресценция). Доказването на антигени на *C. pneumoniae* с моноклонални антитела чрез DFA (директен флуоресцентен тест) е с по-ниска чувствителност в сравнение със серологичното изследване. PCR за ДНК на *C. pneumoniae* е с най-голямо предимство спрямо останалите методи поради бързината, чувствителността и специфичността.

4. Атипична микоплазмена пневмония

Пневмонията продължава дълго и отзвучава бавно. Определят се специфични антитела срещу Микоплазма пневмоние (*anti-Mycoplasma pneumoniae* антитела). С най-голямо диагностично значение са *anti-Mycoplasma pneumoniae* IgM, индикатор за свежа инфекция. Показания – микоплазмена или друга атипична пневмония; други екстрапулмонални микоплазмени инфекции (енцефалити, нефрити, артропатии, перикардити, миокардити, конюнктивити, увеити, ретинити, ирити).

5. Марсилска треска

Марсилската треска е кърлежо-предавана рикетсиоза. Определят се антитела срещу Рикетсия конори (*anti-Rickettsia conorii* антитела) IgM и IgG. Показания за изследване са остър стадий на марсилска треска, ухапване от кърлеж (търсят се IgM) и напреднала марсилска треска (IgG).

6. Чести стрептококови ангини и постстрептококови заболявания

Определя се антистрептолизин титър (AST) – антитела срещу стрептолизин О на *Streptococcus pyogenes*, причинителя на стрептококовия тонзилит. Показания – при съмнение за хронични или чести стрептококови инфекции, причинени от *Streptococcus pyogenes* (тонзилити, фарингити, ларингити); ревматична болест, постстрептококов реактивен артрит, гломерулонефрит. Използва се нефелометрия, турбидиметрия или латекс-аглутинация.

С. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СПЕЦИФИЧНИ ВИРУСНИ АНТИГЕНИ И АНТИВИРУСНИ АНТИТЕЛА. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВИРУСНИ НУКЛЕИНОВИ КИСЕЛИНИ

1. Вирусни хепатити

Разпространени с различна честота по целия свят като епидемични или спорадични заболявания с голямо социалномедицинско значение, вирусните хепатити се различават по механизъм на предаване, но имат сходни клинични признаци и локални възпалителни промени в черния дроб. Серологичната диагноза е най-достъпният подход за доказване етиологията на вирусните хепатити. Специфичността на антиген-антитяло реакцията позволява да се търсят антивирусни антитела в серума на пациента. Определят се:

1.1. Anti-HAV IgM (при остра форма на хепатит А), anti-HAV IgG (при анамнестична, но и напреднала инфекция), anti-HAV total (за доказване на поствакцинален отговор). Anti-HAV IgM се откриват още в инкубационния период, достигат висок титър в първите дни на болестта и изчезват към 3-6-и месец. Малко по-късно се появяват anti-HAV IgG, които се запазват дълго и маркират продължителността на придобития имунитет.

1.2. При остра форма на хепатит В, прекарана инфекция, хронична форма или поствакцинален имунитет – доказват се IgM срещу ядрен антиген (anti-HBc-IgM), тотални антитела срещу ядрен антиген (anti-HBc total), антитела срещу повърхностен антиген (anti-HBsAg), австралийски антиген (HBsAg), антитела срещу енvelop антиген (anti-HBe), енvelop хепатит В-антиген (HBeAg). В изследването им се използват различни методи – ELISA, електрохемилюминесценция (ECLIA), имуноанализ на микрочастици (MEIA). Позитивирането на тези показатели настъпва по различно време в хода на заболяването, затова се изследват в комбинация, която позволява да се разпознаят етапът и формата на HBV инфекцията. При остър хепатит В се откриват HBsAg и anti-HBc IgM. При хроничен хепатит В освен HBsAg се доказват anti-HBcIgG и HBeAg. Появата на HBeAg е белег на активна вирусна репликация и висока инфекциозност в кръвта, а установяването на anti-HBe антитела в острата фаза е признак за благоприятно протичане. В „прозоречния“ период на острата инфекция не се откриват HBsAg и anti-HBs антитела поради образуване на имунни комплекси и диагнозата се осигурява от наличието на anti-HBc IgM. Допълващ метод е полимеразната верижна реакция (PCR) от кръв на болен, която измерва количеството на вiremията (т.нар. вирусен товар). Тя позволява да се установят и т.нар. окултни форми на хепатит В, при които не се открива HBsAg, но се позитивират anti-HBc антителата.

1.3. Антитела срещу вируса на хепатит С (anti-HCV IgG или тотални) за скрининг за хепатит С вирусна инфекция. Те се появяват след остра HCV инфекция, която най-напред се открива с PCR в реално време. После специфичните антитела могат да се откриват с години. Изчезването на вирусната РНК от серума става обикновено към 6-ия месец и е признак за излекуване, докато персистирането ѝ – за хронифициране.

1.4. Антитела в серума срещу вируса на хепатит D (anti-HDV) за скрининг за хепатит D вирусна инфекция – при остра anti-HDV IgM, а при хронична – anti-HDV IgG при липса на IgM. И в двата случая е налице HBsAg, тъй като заразяването с хепатит D може да стане едновременно с HBV (коинфекция) или да настъпи на фона на вече развил се хроничен хепатит В (суперинфекция). PCR в реално време открива HDV генома в кръвта.

1.5. PCR анализ в реално време. Определянето на нивата на HBV ДНК или HCV РНК в серума се превърна във важен инструмент за идентифициране на индивиди с висок вирусен товар, който предполага и висока инфекциозност; за проследяване на прогресията на заболяването и ефикасността на антивирусните терапии; за откриване на резистентни мутанти и за идентифициране на рецидив след прекъсване на антивирусна терапия.

Количественото определяне на нуклеиновата киселина с помощта на количествена PCR в реално време (qRT-PCR) е изключително точна и възпроизводима технология. Всеки кръг от амплифика-

ция води до излъчване на флуоресцентен сигнал, а броят на сигналите за цикъл е пропорционален на количеството на прицелната нуклеинова киселина в изходната проба. Най-често използваните флуоресцентни съединения в qRT-PCR са багрилото SYBR Green и TaqMan сондата. Използват се вътрешни контроли за валидиране на екстракцията на нуклеинови киселини и амплификацията, както и набор от стандарти, обикновено 4.

2. HIV инфекция/СПИН

Синдромът на придобита имунна недостатъчност (СПИН) е опасна вирусна инфекция със значително намаление на броя на Т-хелперните лимфоцити, което води до имунен дефицит с развитие на опортюнистични инфекции и неоплазии. Серологичното изследване за HIV се основава на определяне на специфични вирусни антигени и специфични анти-HIV антитела (anti-HIV 1, 2; p24 антиген). Има стандартен алгоритъм за изследване на HIV и интерпретация на резултатите. Първа стъпка е скриниране за антитела, най-често с ELISA. Извършва се двукратно изследване при положителен резултат, след което се потвърждава (втора стъпка) с имуоблот. При него се търсят антитела срещу различните вирусни антигени и след позитивирането им на пациента се съобщава, че е серопозитивен за HIV. Специфичните анти-HIV антитела се появяват бавно, понякога дори 6 месеца след заразяването, но към 14-20-и ден се открива p24 антигенът. При изследване на новородени от HIV (+) майки доказването на анти-HIV антитела е недостатъчно, тъй като те могат да са пасивно придобити от майката. Прилага се PCR за вирусната РНК, която може да се установи и при възрастни около 1 седмица след заразяването – в „прозоречния период“. Този метод в количествения му вариант се използва и за проследяване на ефекта от анти-HIV лечението.

3. Цитомегаловирусна (CMV) инфекция

CMV е лимфотропен вирус, който предизвиква латентна инфекция в Т-лимфоцити, макрофаги, костномозъчни и др. клетки. Реактивация на латентната инфекция до тежко и фатално протичане се наблюдава при имunosупресирани (HIV пациенти, след кортикостероидно или друго имunosупресивно лечение). Извършва се скрининг за anti-CMV IgM и anti-CMV IgG при суспекция за остра или латентна цитомегаловирусна инфекция. Наличието на специфични IgM е доказателство за остра инфекция с CMV, но също и за реинфекция или реактивиране на латентната такава. Тези антитела персистират няколко месеца. Маркер за анамнестична CMV инфекция са антителата от клас IgG в серума на пациента. По-голяма диагностична стойност за активна CMV инфекция има количественото определяне с PCR на вирусен генетичен материал в левкоцити, ликвор и/или фекални проби на пациента.

4. Инфекциозна мононуклеоза

Инфекциозната мононуклеоза е остро инфекциозно заболяване, причинено от EBV (вируса на Epstein-Barr), адаптиран към човешките В-лимфоцити, където причинява пожизнена инфекция. Този вирус притежава изразена трансформираща активност за В-клетките и в отсъствие на ефективен Т-клетъчен имунен контрол може да доведе до лимфопролиферативни заболявания като лимфом на Бъркит и назофарингеален карцином. При показания за остра, реактивирана или латентна инфекциозна мононуклеоза, както и лимфопролиферативни заболявания, се определят специфични антивирусни антитела срещу капсиден антиген, ранен антиген и нуклеарен антиген на EBV – anti-EBV-VCA IgM/IgA/IgG; anti-EBV-EA IgA/IgG; anti-EBNA IgG. Доказването на специфични IgM е трудно поради ниските им титри, поради което може да се направи директна детекция на EBV от клиничен материал с PCR.

5. Херпес симплекс

Херпесните вируси имат способност да предизвикват латентни инфекции, които могат да се реактивират. Обикновено протичат бенигнено, но при имунокомпрометирани могат да причинят значителна болестност и смъртност. Инфекцията от HSV-1 може да се прояви най-често като лабиален херпес, остър гингивит, стоматит или кератит, а в редки случаи като херпесен менингоенцефалит или енцефалит. Генитален херпес се предизвиква от HSV-2. Определят се специфични антивирусни антитела срещу ви-

руса на обикновения херпес (anti-HSV-IgM и anti-HSV-IgG) при остра или латентна вирусна инфекция от херпес симплекс, които във висок титър предпазват от генерализиране на инфекцията. За уточняване на имунната реактивност е препоръчително да се изследват флоуцитометрично основните популации на имунните клетки поради водещата роля на клетъчния имунитет и NK клетките за унищожаване на инфектираните клетки. При херпесните менингити и менингоенцефалити като най-бърз и ефективен диагностичен подход се прилага PCR от ликвор.

6. Варицела/херпес зостер

Варицелата е класическа детска екзантемна инфекция с висок контагиозен индекс. След преболеване вирусът се запазва в латентна форма в дорзалните коренчета на гръбначния мозък и при реактивация може да засегне кожата, най-често по хода на интеркосталните нерви. При имунокомпрометирани херпес зостер може да протече като генерализирана инфекция с фатален изход. Определят се специфични антивирусни антитела срещу варицела зостер вирус (anti-VZV-IgM и anti-VZV-IgG) като скрининг за остра или латентна варицела зостер вирусна инфекция. С PCR може бързо да се докаже вирусът директно от клинични материали.

7. Морбили

През последните години тази типична детска инфекция, протичаща остро, с характерен обрив и висока контагиозност, има епидемична изява. Въпреки че клетъчно-медиаторният имунитет е отговорен за контрола на инфекцията, имунологичната диагностика се извършва с двойни проби серум (в началото на заболяването и 2-3 седмици по-късно) за определяне на специфични антиморбилни антитела – IgM и IgG. Показателно за свежа инфекция е установяване на специфичните IgM в единична серумна проба и поне 4-кратното нарастване на титъра на антителата във втората проба.

8. Рубеола

Рубеолата е остра инфекциозна болест с умерена интоксикация, увеличени лимфни възли и макуло-папулозен екзантем. Тя е високо контагиозна, протича епидемично и спорадично, а възприемчивостта е всеобща. Определят се специфични антивирусни антитела при рубеола – anti-rubella IgM и anti-rubella IgG като скрининг за остра или латентна/анамнестична рубеола. Доказването на специфични IgM в единична серумна проба и нарастването на антителния IgG титър във втората серумна проба, взета след 10-12 дни, е признак за остра рубеолна инфекция. При новородено е необходимо да се изследват серийни серумни проби. При намаляване на нивото на антивирусните IgG се приема, че се касае за трансплацентарно преминали майчини антитела и липса на инфекция у детето, докато установяването на специфични IgM и нарастването на антирубеолните антитела е маркер за прясна инфекция.

9. Епидемичен паротит

Това е инфекциозно заболяване с изразен едем на едната или по-рядко на двете паротитни жлези. Болният (с изявена или безсимптомна инфекция) е контагиозен няколко дни преди и след появата на характерните признаци. Клиничната картина е типична и серологично изследване се прилага при суспектна безсимптомна инфекция. Определят се специфични антипаротитни антитела IgM и IgG в двойни проби серум, взети съответно в острата фаза на заболяването и 2-3 седмици по-късно. Свежата инфекция се маркира от наличие на специфични IgM в единична проба и поне 4-кратно нарастване на титъра на антителата във втората серумна проба. Доказването на морбилния геном се прави от серум чрез PCR в реално време.

10. ВК вирус

ВК вирусът е изолиран през 1971 г. от урината на реципиент с уретерна стеноза след бъбречна трансплантация, но едва 20 години по-късно ВК е разпознат като причина за интерстициален нефрит и загуба на присадката при този контингент болни. ВК вирусът е почти повсеместен при възрастни със серопозитивност над 90%. След първичната инфекция вирусът се установява в латентност в уроепителите и бъбречните тубулни епителни клетки. При имunosупресия се реактивира и реплицира, предиз-

виквайки каскада от събития, започващи с разрушаване на тубулните клетки и вирурия. Впоследствие ВК се размножава в интерстициума и преминава в перитубулните капиляри, причинявайки виремия и евентуално навлиза в присадката, което води до различни тубулоинтерстициални лезии и нефропатия. При пациенти с трансплантация на хемопоетични стволови клетки реактивацията може да предизвика хеморагичен цистит. Вирусната репликация се изследва в клиничен материал серум/плазма и/или урина при пациенти след бъбречна или стволовоклетъчна трансплантация посредством PCR в реално време.

11. JC вирус

JC вирусът (JCV) е член на семейството Polyomaviridae. Предаването на JCV не е напълно изяснено. JCV специфични антитела се откриват при приблизително 70% от възрастните и първичната инфекция протича в ранна детска възраст, обикновено асимптомно. След това вирусът остава като персистираща латентна инфекция в бъбреците и се отделя в урината. В контекста на имunosупресивни състояния като СПИН и трансплантации JCV се разпространява в ЦНС и литично инфектира олигодендрцити, причинявайки демиелинизиращо заболяване, известно като прогресивна мултифокална левкоенцефалопатия. Вирусна активна инфекция се доказва посредством PCR в реално време.

12. Човешки херпесен вирус тип 6 (HHV-6).

Човешки херпесвирус 6 (HHV-6) е шестият открит херпесен вирус. Изолиран през 1986 г. при пациенти с лимфопролиферативни заболявания, HHV-6 понастоящем се счита за Т-клетъчен лимфотропен вирус с висок афинитет към CD4⁺ лимфоцитите. Първичната инфекция обикновено се появява при кърмачета и е най-честата причина за фебрилни гърчове при деца на възраст 6-24 месеца. Острата HHV-6 инфекция се среща рядко при имунокомпетентни възрастни, но може да се прояви като моноклеозно заболяване, характеризиращо се с треска, лимфаденопатия и хепатит или енцефалит, с отрицателни резултати от теста за CMV или Epstein-Barr вирус (EBV). Други клинични състояния, свързани с реактивирането на HHV-6, включват хепатит, идиопатичен пневмонит, костномозъчна супресия, енцефалит, треска и обрив, болест на присадка срещу приемник (GVHD) и забавено заселване на присадката. HHV-6 е изолиран от различни тъкани, клетки и течности в съчетание със следните състояния: Кикучи лимфаденит, лимфом, лимфаденопатия, синдром на свръхчувствителност, индуциран от лекарства (DIHS), или лекарствена реакция с еозинофилия и системни симптоми (DRESS), синдром на Съогрен, саркоидоза, системен лупус еритематозус, синдром на хроничната умора (CFS), синдром на Guillain-Barre, множествена склероза. Активна вирусна репликация в кръвни проби и друг биологичен материал се доказва чрез PCR в реално време.

D. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СПЕЦИФИЧНИ АНТИГЕНИ ПРИ ИНВАЗИВНИ МИКОЗИ

Инвазивната кандидоза е опортюнистична ендегенна микоза. Втората по честота инвазивна микоза е инвазивната аспергилоза. Те атакуват имunosупресирани индивиди, лекувани продължително с антибиотици или кортикостероиди, с тежки заболявания и обменни нарушения (диабет). Серологичната диагноза включва доказване на мананов антиген на Candida с ELISA, който се търси при инвазивни кандидози и при фебрилни неутропении, а галактомананов аспергилен антиген – при инвазивни аспергилози и фебрилни неутропении. Освен от серум, галактоманановият антиген може да се изследва и от бронхоалвеоларен лаваж.

E. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СПЕЦИФИЧНИ АНТИТЕЛА ПРИ ПАРАЗИТОЗИ

1. Ехинококоза

Ехинококозата е заболяване с хроничен ход, при което могат да липсват симптоми в продължение на много години. Клиничната изява зависи от органната локализация на паразита – черен дроб, бял дроб, бъбреци, кости, мозък и др., но като цяло заболяването е с мултиорганна локализация. Определят

се специфични серумни антиехинококови антитела – IgG. Препоръчително е потвърждаването на специфичните антитела от клас IgG към *Echinococcus granulosus* с имуоблот.

2. Токсоплазмоза

Токсоплазмозата е паразитно заболяване, причинено от едноклетъчен паразит – *Toxoplasma gondii*. Ключови за поставянето на диагнозата са серологичните изследвания. Показателни за остра инфекция са откриването на специфични антитела от клас IgM и нарастването на титъра на IgG антитела четирикратно в рамките на две седмици. Стабилно ниво на последните предполага стара инфекция. Директно установяване на паразитозата е възможно чрез PCR или биопсия, или спинална пункция, доказващи самите паразити.

3. Трихинелоза

Трихинелозата е паразитно заболяване, което се характеризира с остро и хронично протичане. Човек се засяга след консумация на трихинелозно месо. Най-честите симптоми са **температура, оток на лицето** (предимно около очите), мускулни болки и изразен токсоалергичен синдром. В имунодиагностиката се прилага най-често *ELISA* – измерват се титри на антитела, които се позитивират най-рано 14 дни от началото на симптомите. За свежа инфекция показателно е откриването на **специфични IgM**, които се задържат до няколко седмици. Малко след тях в серума се откриват и IgG антитела, които са показател за анамнестична инфекция и могат да се задържат дълго време. С *ELISA* в урина и изпражнения може да бъде установено наличието на специфични антигени, които се откриват на 4-5-ия ден от заразяването.

4. Токсокароза

Токсокарозата е хелминтоза, с хронично-рецидивиращо протичане, засягане на вътрешните органи и еозинофилия, в резултат на продължителната миграция на ларви основно на кучешките и котешките нематоди *Toxocara canis* и *T. cati*. Определят се специфични антитоксакарни антитела IgG. Показания: неизяснени алергични заболявания, неповлияващи се от етиологично лечение; астматични състояния и рентгенографски данни за еозинофилни инфилтрати; ретинити и очни грануломи предимно в детска възраст; неясни симптоми от ЦНС – от огнищни поражения до менингити; неясни, рецидивиращи фебрилни състояния. Серумите с положителен или граничен резултат в *ELISA* се изследват допълнително и с имуоблот.

5. Лайшманиоза

Лайшманиозата е трансмисивно заболяване, предизвикано от едноклетъчен паразит от род Лайшмания. Преносители на този паразит са насекоми от род *Phlebotomus*. Заболяването засяга кожата и вътрешните органи на човека. Инфектирането настъпва при ухапване от насекомите, които са заразени от болни животни. В редки случаи инфекция с паразита може да настъпи в резултат на кръвопреливане или при трансплантация на органи. Определят се специфични антилайшманиозни антитела IgM и IgG при кожна, кожно-лигавична или висцерална лайшманиоза. В допълнение на имунодиагностиката е и PCR.

5. Алгоритъм за имуномодулиращо лечение на сензибилизирани реципиенти за органна трансплантация*

Пациентите за органна трансплантация, сензибилизирани към HLA антигени по време на бременност, чрез кръвопреливане или при предишна трансплантация, могат да развият антитела срещу HLA. В листата на чакащите бъбречна трансплантация в България процентът на сензибилизирани пациенти е 20.45%. Обект на по-комплексна предтрансплантационна имунологична подготовка са хиперсензибилизираните пациенти с панел реактивни антитела (PRA) > 85% (4.34% от листата на чакащите), при които е необходим подбор на донор с висока степен на HLA съвместимост. Наличието на HLA IgG антителата срещу органа на донора са контраиндикация за бъбречна трансплантация, а образуването им след трансплантацията се свързва с по-голяма честота на отхвърляне и по-лоша преживяемост на присадката.

Наличието, титърът и специфичността на анти-HLA антителата се определят чрез кръвни тестове в акредитирани (EFI) структури по клинична имунология.

Имуномодулиращо лечение на сензибилизирани реципиенти за органна трансплантация се провежда с **гама-глобулин за интравенозна инфузия и/или терапевтична афереза** като при:

- пациентите с донор-специфични алоантитела (DSA) при наличие на жив донор се отстраняват напълно DSA, което се потвърждава от директната проба за съвместимост – кросмач реакция
- хиперсензибилизираните пациенти с анти-HLA антитела (алоантитела), клинично подходящи за предстояща бъбречна трансплантация (до 1 месец) с цел е силно понижаване на % PRA.
- пациенти с трансплантиран бъбрек с HLA антитела и/или реакция на отхвърляне на трансплантата, неповлияваща се от кортикостероиди и/или поликлонални антитела

Терапевтичната филтрационна плазмафереза се осъществява апаратно, със специални филтри, наречени плазмасепаратори. Посредством тях кръвта се разделя на нейните основни съставки – плазма и формени елементи. Формените елементи се връщат в кръвното русло на пациента. В отделената плазма се намират алоантителата, затова терапевтичното въздействие се осъществява върху плазмата по два основни метода:

- отстраняване и заменяне на отделената плазма с подходящи белтъчни и високомолекулни разтвори (плазмообмен)
- преминаване на отделената плазма през съответен филтър (каскадна плазмафереза) и извличането на патогенните съставки (плазмабсорбция)

В лечебната схема се включват **медикаменти от следните лекарствени групи**, използвани самостоятелно или в комбинация:

- **глюкокортикостероиди** – метилпреднизолон, дехидрокортизон – 5-15 mg/kg/24 h – 3 апликации през ден
- **имуносупресори** – по кратка характеристика (цилофосфамид, моноклонално антитяло)
- **моноклонално антитяло** с насочено действие към В-лимфоцити за потискане на продуцираните от тях антитела
- **нормален човешки имуноглобулин за интравенозно приложение.**

6. Алгоритъм за диагностика и лечение при безплодие и нарушения на бременността с автоимунен и алоимунен компонент

ЗАБОЛЯВАНИЯ: МКБ 10 (N 97, O03, O14, O14.0, O14.1, O14.9, O15, O22, O28)

Необходими изследвания:

1. Генетични: кариотип на двойката партньори; кариотип на изхвърлен фетален материал; тромбофилия (фактор V Leiden, 20210 мутация на протромбиновия ген, PAI, MTHFR с определяне нивото на хомоцистеина и др.)
2. Инструментални: хистероскопия, ХСГ, ехографски, вкл. доплерова ехография
3. Микробиологични
4. Ендокринологични – хормони на щитовидната жлеза, пролактин, лутеотропен хормон, фоликулостимулиращ хормон, антимюлеров хормон, кръвна захар, ехография на щитовидна жлеза.
5. Имунологични: антифосфолипидни антитела, лупусен антикоагулант, НК клетки, Th17/Treg, ANA, блокиращи антитела, антиовариални антитела, антиспермални антитела, спермална ДНК фрагментация, HLA крос мач, определяне на алоантитела, KIR хаплотип/HLA C1/2 лиганди, определяне на цитокини, HLA типизиране
6. Имунохематологични – кръвногруппова принадлежност по ABO и резус система, антиеритроцитни антитела, антитромбоцитни антитела
7. Коагулационни – INR, aPTT.

Терапия със следните лекарствени групи – самостоятелно или в комбинация (в зависимост от патологията):

1. Acetysal – 80-100 mg
2. Нискомолекулен heparin
3. Prednison
4. Интравенозни имуноглобулинови препарати (150-400 mg/kg телесно тегло)
5. Пречистено соево масло 20% (5-10 ml)
6. Лимфоцитна имунизация
7. Имуносупресивни медикаменти
8. Хормони.