ПРАВИЛА ЗА ДОБРА МЕДИЦИНСКА ПРАКТИКА В КЛИНИЧНАТА ИМУНОЛОГИЯ

1. **Вносител** - Експертен съвет по клинична имунология и Българска асоциация по клинична имунология (БАКИ)

2. **Източници** – библиографска справка, европейски и световни консенсуси

3. **Основна специалност** – клинична имунология

4. **Допълнителни специалности** - всички специалности, свързани с диагностика и лечение на имуно-медиирани заболявания

5. **Ключови думи** - имунологични показатели, първични имунни дефицити, автоимунни заболявания, хемопатии, репродуктивни нарушения с автоимунен компонент, инфекциозни заболявания

6. **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, Фани Мартинова, Трифон Червенков

СЪДЪРЖАНИЕ

I.ВЪВЕДЕНИЕ В ПРАВИЛАТА ЗА ДОБРА МЕДИЦИНСКА ПРАКТИКА В КЛИНИЧНАТА ИМУНОЛОГИЯ 5

II.ПРАВИЛА ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ИМУНОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ИМУНОДИАГНОСТИКА НА ИМУНО-МЕДИИРАНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ 6

1. Определяне на протеини в серум и други биологични течности: общи имуноглобулини ИгМ, ИгГ, ИгА, ИгГ подкласове, общи и/или специфични ИгЕ, С3 и С4 компоненти на комплемента, С1 естеразен инхибитор, активност на комплемента, криоглобулини 6

2. Определяне на моноклонални протеини 6

2.1. Установяване, идентифициране на типа и количествено определяне на моноклонални имуноглобулини ИгГ, ИгА, ИгМ, ИгД, ИгЕ, капа и ламбда леки вериги 7

2.2. Количествено определяне на свободни леки вериги и капа/ламбда съотношение..... 7

2.3. Количествено определяне на двойки тежки/леки вериги 7

3. Определяне на ревматоиден фактор (РФ), антистрептолизинов титър (АСТ) и С реактивен протеин (CRP) 7

4. Определяне на антитела срещу цикличен цитрулиниран протеин (CCP) и мутирал цитрулиниран виментин (MCV) 8

5. Определяне на антинуклеарни антитела (АНА) в серум 8

6. Определяне на антимитохондриални антитела (АМА) в серум 9

7. Определяне на специфични автоантитела срещу различни клетъчни (нуклеарни и цитоплазмени) антигени 9

7.1. Определяне на антитела срещу различни нуклеарни антигени: dsDNA, ssDNA, Sm, RNP, ss-A(Ro), ss-B (La), Scl-70, центромери, хистони, nRNP/U1RNP, PCNA, RibP и други 9

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…… 9

7.3. Определяне на антитела срещу, центромерни антигени (CENP-B,CENP-A), 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 10

7.4. Антитела срещу AMA-M2, SP100, PML, gp210, LKM-1, LC-1, SLA/LP..... 10

8. Определяне на антинеутрофилни цитоплазмени антитела (АНЦА), анти-протеиназа 3 (Pr3), анти-миелопероксидаза (MPO), LAMP-2, анти-гломерулобазални антитела (GBM) 10

9. Определяне на антигладкомускулни антитела (ASMA) в серум 11

10. Определяне на антифосфолипидни антитела (APL) 11

11. Определяне на антигломерулобазално-мембранни (AGBM) антитела..... 11

12. Определяне на антитела към антигени на щитовидната жлеза - анти-тиреоглобулинови антитела (ТАТ), антитела срещу тиреоидна пероксидаза (ТРО) и антитела срещу рецептор за TSH (TRAb) 12

13. Определяне на островноклетъчни антитела при захарен диабет тип 1 тип LADA 12
14. Определяне на инсулинови автоантитела (IAA) и инсулинови антитела (IA) 12
15. Определяне на автоантитела към мозъчни и неврални антигени в серум и ликвор..... 12
16. Определяне на антитела срещу гастрални и чревни антигени 13
17. Количествено определяне на цитокини в супернатанти от стимулирани in vitro клетки .. 13
18. Определяне на спонтанна и стимулирана активация и пролиферация на лимфоцити..... 13
19. Определяне на процентни съотношения и абсолютен брой на лимфоцитни популации в периферна кръв 14
20. Количествено определяне на антиген-специфични $CD4^+$ и $CD8^+$ Т лимфоцити..... 14
21. Определяне на фагоцитоза и оксидативен взрив 15
22. Флоуцитометрично имунофенотипизиране на хематологични заболявания 15
22.1. Флоуцитометрично имунофенотипизиране на левкемии 15
22.2. Флоуцитометрично имунофенотипизиране на левкемизирали зрялоклетъчни лимфоидни неоплазии (лимфоми)..... 16
22.3. Флоуцитометрично имунофенотипизиране на плазмоклетъчни неоплазии..... 16
22.4. Флоуцитометрично имунофенотипизиране на установяване на минимална (измерима) резидуална болест 16
22.5. Флоуцитометрично определяне на дефицит повърхностни гликозилфосфатидилинозитол-свързващи молекули при пароксизмална нощна хемоглобинурия 16
23. Флоуцитометрично определяне на броя $CD34^+$ хемопоетични стволови клетки 17
24. Определяне на химеризъм след трансплантация на хемопоетични стволови клетки..... 17
25. Флоуцитометрично определяне на *in vitro* алерген специфична активация/дегранулация на базофили 17
26. Флоуцитометрично изследване на клетъчен цикъл и/или количество ДНК. 17
27. Определяне на HLA системата 17
28. Определяне на циркулиращи алоантитела 18
29. Кросмач реакция 18
30. Имуноцитохимично и имунохистохимично изследване на интрануклеарни/ цитоплазмени/ мембранни антигени и/или генетични последователности. 18
31. Определяне на инфекциозни повърхностни антигени или антитела в кръвен серум или плазма 18
32. Изследване на клонални пренареждания на гените на тежки имуноглобулиниви вериги (IgH) и Т-клетъчни рецептори (TCR) 19
III. ПРАВИЛА ЗА ДОБРА МЕДИЦИНСКА ПРАКТИКА ПРИ НЯКОИ ИМУНО-МЕДИИРАНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ 19

1. Правила за добра медицинска практика за диагностика и лечение на първични имунни дефицити (ПИД)..... 19

2. Диагностични имунологични подходи при автоимунни заболявания..... 57

3. Правила за добра лабораторна имунологична диагностика и мониториране в хематологията 70

4. Правила за добра медицинска практика в имунодиагностиката на инфекции и инфекциозни заболявания 85

5. Алгоритъм за имуномодулиращо лечение на сенсибилизирани реципиенти за органна трансплантация* 93

6. Алгоритъм за диагностика и лечение при безплодие и нарушения на бременността с автоимунен компонент 94

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

Клиничната имунология е основна клинико-диагностична медицинска специалност и научна дисциплина. Съществена част от нея е диагностичната ѝ компонента –лабораторната имунология. Диагностичната оценка на имунната функция и фенотип е от особено значение за диагнозата и мониторирането на голям брой имуномедиирани болести. Клиничната имунология играе ключова роля в диагностиката и мониторирането на имунодефицитните болести, автоимунните болести, доброкачествените и злокачествени хематологични болести, при диагностика и лечение на безплодие и нарушения на бременността с автоимунен компонент и в имунологичната диагностика на инфекциозните заболявания. Освен това задълбоченото разбиране на клиничната лабораторна имунология е от съществено значение за ефективното управление на трансплантацията на солидни органи и хемопетични 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 клиничната имунология е основно място за имунологично изследване на пациенти от почти всяка клинична специалност. Обхватът на клиничната имунология е доста 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 взаимствано от опита на други страни при изготвяне на правила и насоки, свързани с диагнозата 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 имуно-медиирани заболявания.

2. Правила за добра медицинска практика при някои имуно-медиирани 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 имуномедиираните болести.

II. ПРАВИЛА ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ИМУНОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ИМУНОДИАГНОСТИКА НА ИМУНО-МЕДИИРАНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

1. Определяне на протеини в серум и други биологични течности: общи имуноглобулини ИгМ, ИгГ, ИгА, ИгГ подкласове, общи и/или специфични ИгЕ, С3 и С4 компоненти на комплемента, С1 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 ИгМ, ИгГ и ИгА;подкласовете на ИгГ; С3 и С4 компонентите на комплемента и С1 естеразен инхибитор чрез нефелометрия, турбидиметрия и други утвърдени методи;

да определя функцията на С1 естеразен инхибитор с хромоген-субстратни или други утвърдени методи;

да определя активност на комплемента (класически път - СН50) чрез имуноензимен (ИЕМ) и други утвърдени методи.

да изследва общите ИгЕ и/или специфични ИгЕ чрез имуноензимни, радиоимунологични, флуориметрични, хемилуминесцентни и други утвърдени методи.

Показания и *интерпретации* при определянето на имуноглобулините и фракциите на комплемента: серумните имуноглобулини са понижени при първични и вторични имунодефицити; ИгГ са увеличени в хроничната фаза на възпалението, при автоимунни болести, при ИгГ миелом; ИгМ са увеличени в острата фаза на възпалението, при ИгМ миелом, в острата фаза на автоимунните болести; ИгА е увеличен при хронични чернодробни болести, ИгА гломерулонефрит, васкулит на Schonlein-Henoch; С3 и С4 са намалени при автоимунните заболявания; дефицит на С4 и С1 естеразния инхибитор се установява при наследствения ангиоедем; ИгЕ и специфичните ИгЕ се доказват в серума на болни с алергични болести и паразитози; активността на комплемента е понижена при автоимунни болести.

Лабораторията по клинична имунология трябва да е в състояние да определя количеството и качествения състав на криоглобулините в серума. След флеботомия кръвта се събира в предварително затоплена до 37^{o}C епруветка без антикоагулант и се съхранява на тази температура до настъпване на коагулация (около 1 час). След това се центрофугира и отделеният серум се поставя в хладилник (4^{o}C) за седем дни. Пробата се проследява ежедневно за появата на имунокриопреципитат - качествено определяне на криоглобулини.След центрофугиране на 4^{o}C, криопреципитатът може да бъде измерен с калибровъчна епруветка, разтворен отново на 37^{o}C и изследван за определяне на изотипа и клоналността.

Показания: автоимунни болести, злокачествени хемопатии.

2. Определяне на моноклонални протеини

Описание: 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 ИгГ, ИгА, ИгМ, ИгД, ИгЕ, 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 – среща се при 3.2% над 50-годишна възраст и над 5% над 70, по-често при мъже. Изследвания за установяване и иденитифициране 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 – асимптоматичен (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.

Показания: В-клетъчни и плазмоклетъчни неоплазии

Методи: белтъчна електрофореза, имунна електрофореза, имунофиксация

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 каппа 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.

Показания: 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 имуноглобулини (т.е. IgGκ, IgGλ, IgAκ, IgAλ, IgMκ и IgMλ), е възможно прецизно измерване на цели имуноглобулиниви вериги и определяне на съотношението (напр. IgGκ / IgGλ), чрез което да се осигури количествена оценка на евентуална клоналност; както и да се оцени имуносупресията 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 ИгГ, което може да бъде от класове ИгМ, ИгГ или ИгА. Повечето методи откриват ИгМ-РФ. РФ отсъства в около 15% от пациентите с ревматоиден артрит, а около15% от здравите индивиди могат да бъдат РФ положителни в нисък титър. РФ се открива и при други автоимунни болести – синдром на Сьогрен, системен лупус еритематозус (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 острото и хронично възпаление.

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

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

Описание: Анти-CCP и анти-MCV са сравнително нови 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 също се откриват при някои форми на ювенилен артрит, псориатричен артрит, реактивен артрит, СЛЕ, синдром на Сьогрен, припокриващи (overlap) синдроми, възпалителни миопатии и активна туберкулоза.

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

5. Определяне на антинуклеарни антитела (АНА) 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 транслацията и др. Изследването на общи АНА е основен скриниращ подход в диагностиката на системните автоимунни заболявания, но АНА 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 (СЛЕ); лекарствено-индуциран лупус, синдром на Sjogren, прогресивна системна склеродермия, полимиозит/дерматомиозит, смесена съединително-тъканна болест; ревматоиден артрит, ювенилен ревматоиден артрит, хроничен активен хепатит, хроничен персистиращ хепатит, остър вирусен хепатит, първична билиарна цироза, автоимунен хепатит. Значимостта на изследването на АНА е представена на табл. 1.

Табл. 1. Значимост на изследването на АНА при някои заболявания*

Заболяване	**Значимост**
СЛЕ	+++
лекарствено-индуциран лупус	+++
синдром на Sjogren	+++
прогресивна системна склеродермия	+++
полимиозит/дерматомиозит	+
смесена съединително-тъканна 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

Методи за изследване: Използват се утвърдени техники като индиректна имунофлуоресценция (ИИФ) върху препарати от клетъчни линия (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 АНА. Индиректната имунофлуоресценция 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 АНА). Предимство на ИИФ за определяне на АНА е определянето на специфични флуоресцентни образи, които предполагат клинична асоциация с определени заболявания и насочват последващото разширено изследване за специфичността на АНА - т.н. АНА типиране. Чувствителността на АНА/ИИФ на субстрат HEp-2 е достатъчно висока за идентифициране на мнозинството от клинично значимите автоантитела при разреждане на серума в титър 1/80 или 1/160.

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 имунофлуоресценция (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), Scl-70, центромери, хистони, nRNP/U1RNP, PCNA, RibP 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 високо специфични за СЛЕ, но се открива само в около 25% от пациентите. Анти-U1RNPсе откриват при пациенти със СЛЕ, системна склероза и при пациенти със смесена съединително-тъканна болест (ССТБ). Анти-SSA, анти-SSB се доказват предимно при пациенти със синдром на Сьогрен 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 ИгГ) 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 лекарствено-индуциран лупус.

Методи за изследване: използват се утвърдени техники, като ELISA и/или имуноблот 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

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

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 антисинтетазен синдром, както и при различни форми на overlap. Анти-Jo-1 е най-често откриваното автоантитяло в групата на възпалителните миопатии и т.н. антисинтетазен синдром. Част от автоантителата като TIF1γ и NXP2 често се асоциират с паранеопластично индуцирани миопатии, а други с белодробно интерстициално засягане (анти-Ku).

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

7.3. Определяне на антитела срещу центромерни антигени (CENP-B,CENP-A), 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 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 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 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 антитителa 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, първична билиарна цироза, първичен склерозиращ холангит.

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

8. Определяне на антинеутрофилни цитоплазмени антитела (АНЦА), анти-протеиназа 3 (Pr3), анти-миелопероксидаза (MPO), LAMP-2, анти-гломерулобазални антитела (GBM)

Описание: Определя се наличие, специфичност (според официално приетата номенклатура) и титър/количество на АНЦА, които могат да са антитела срещу протеиназа 3 (Pr3), миелопероксидаза (MPO), LAMP-2. Анти-гломерулобазалните антитела (GBM) са други орган-специфични антитела. АНЦА са важни маркери за диагнозата и активността на автоимунните васкулити от групата на т.нар. АНЦА-асоциирани васкулити. Описват се различни флуоресцентни образи (рАНЦА, атипична рАНЦА, сАНЦА, хАНЦА) с различни клинични асоциации. сАНЦА най-често се асоциират с

грануломатоза на Wegener, микроскопски полиангиит и Churg-Straucs синдром. рАНЦА 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 АНЦА, важни за откриване на васкулити, са Pr3 и MPO**.** Анти-протеиназа 3 антителата са с висока специфичност за грануломатоза на Wegener, докато анти-миелопероксидаза 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 ~~е~~ утвърдени методи като ELISA и/или имуноблот и индиректна имунофлуоресценция. Индиректната имунофлуоресценция на АНЦА определя титър и по възможност тип светене (рАНЦА, атипична рАНЦА, сАНЦА, хАНЦА). ELISAи/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: Антигладкомускулни антитела имат няколко таргетни антигена, намиращи се във филаментите на гладките и напречно набраздени 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 плъши 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 - β2 glycoprotein-I (β2GPI), prothrombin и др.). Най-често в клиничната практика се изследват антикардиолипинови антитела (aCL) и анти-β2GPI от клас ИгГ и ИгМ, 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-β2GPI трябва да са в средно висок или висок титър (т.е. >40 GPL или MPL, или > 99-я персентил). 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.

Методи за изследване: Имуноензимен метод – ELISA с полуавтомятични 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 (количество на АГБМ).

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

Показания: автоимунни заболявания на щитовидната жлеза (лимфоцитарен тироидит, Базедова болест) и други не-тироидни автоимунни състояния като ревматоиден артрит, тип 1 захарен диабет, целиакия

Методи за изследване: ELISA, електро-хемилуминесценция, 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 Кд изоформа (GAD 65).

Показания: при съмнение за захарен диабет тип I; някои неврологични нарушения като синдром на Stiff Man.

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

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

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

Показания: при съмнение за захарен диабет тип I;

Методи за изследване: радиоимунологични техники (златен стандарт за анти-инсулинови антитела, но може да определя и други авотоантитела при диабет тип 1) или ELISA (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 ИгГ и ИгМ изотипове към антигени от централна и периферна нервна система - миелин, миелин базичен протеин (MBP), протеолипиден протеин (PLP), миелин-олигодендроцитен гликопротеин (МОГ), миелин-асоцииран гликопротеин (MAG), 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, синаптозоми, глутаматергични рецептори, глутамат декарбоксилаза (GAD), b-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, радиоимунологични, имуноблот, индиректна имунофлуоресценция.

16. Определяне на антитела срещу гастрални и чревни антигени

Описание: Тук се включват анти-интринзик фактор, анти-париетални клетки (APA), антитела срещу тъканна трансглутаминаза (АТТГ), анти-ендомизиумни антитела (ЕМА), анти-глиадинови (АГлА), анти-Saccharomyces cerevisiae (ASCA), анти-ретикулин автоантитела - ИгГ и ИгА изотип.

Показания: анти-интринзик фактор и анти-париетално клетъчни антитела – при съмнение за автоимунен гастрит, пернициозна анемия и други автоимунни заболявания (болест на Адисон, автоимунен тироидит, инсулино-зависим диабет, първична овариална дисфункция); АТГА, ЕМА, АГлА – при глутенова ентеропатия, вродена атаксия; ASCA – приболест 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 АНЦА, докато при БК – ASCA).

Методи за изследване: имуноензимни – ELISA, имуноблот. Определя се наличие и титър/количество на автоантителата от ИгА и ИгГ 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 IFNγ , освободен в отговор на in vitro стимулация с пептиди, специфични за *M. tuberculosis* се означават като IGRA (Interferon gamma release assays)

Показания: съмнение за имунен 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 ºC, 5% CO_2. Оценката може да се извърши на ниво цяла периферна кръв, единична мононуклеарна 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 CD4 и CD8 Т лимфоцитите. 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 стимулирана in vitro активация отразяват способността на лимфоцитите за провеждане на сигнали през антиген-специфичния и ко-стимулиращите рецептори и за осъществяване на функциите си, както и за обратното им регулиране

Показания: съмнение за първичен имунен дефицит, засягащ сигнални пътища и молекули; вторичен имунен 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) и едно или две антитяла за определяне вида на активираната лимфоцитна субпопулация (напр. CD3, CD3/CD4, CD3/CD8). Изследването включва задължително нестимулирана и изотипна

контроли. *In vitro* активацията се извършва по валидирана методика, с неспецифичен стимулатор (фитохемаглутинин, PMA/йономицин, анти-CD3 антитяло, анти CD2 антитела) 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+) Т лимфоцити, CD3+CD4+ и CD3+CD8+ Т-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 дианостично-лечебния процес.

Показания: първични и вторични имунни дефицити, хронични и рецидивиращи инфекции

Метод за изследване: Флоуцитометрично имунофенотипизиране посредством съответно валидирана дву-, три- и/или многопараметърна имунофлуоресценция. Двуцветното 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 (IFNg или други) в отговор на стимулация с подходящ антиген.

Показания: първични и вторични имунни дефицити, хронични инфекции, изследване на ваксинален отговор и други специфични случаи

Методи за изследване. Многопараметърна флоуцитометрия с комбинация от моноклонални антитела за едновременен анализ на вътреклетъчно експресирани цитокини и повърхностни антигени. Комбинациите за маркиране включват: анти-цитокинови моноклонални антитела (интерферон-γ, TNF- α и други); мка 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 анти-цитокиново мка. 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; 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-хаплотипа на пациента

Активацията се извършва по валидирана методика, за срок от 8 – 20 ч. на 37 °C, 5% CO_2. с антиген-специфични пептиди, според целта на изследването при спазване на общоприетите изисквания за

стерилност. При стимулиране с антиген-специфични пептиди се добавят подходящи ко-стимулатори (напр. анти-CD28 или CD28+CD49d моноклонални антитела). При същите условия задължително се включват неактивирана контрола (проба, не съдържаща антиген-специфичните пептиди) и проба, стимулирана с неспецифичен активатор (фитохемаглутинин, PMA/йономицин, анти-CD3 антитяло) 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);
- флоуцитометрично (дихидродамин DHR-123 като флуорохромен субстрат с отчитане флуоресценцията на образувания родамин).

Показания: хронична хрануломатозна болест.

22. Флоуцитометрично 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 интрацитоплазмени антигени в еритроцити и/или тромбоцити; определя биологично активни молекули в клетъчни лизати и/или серум; количествено определя брой резидуални левкоцити в обезлевкоцитени 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 забоявания - левкемии, лимфоми, плазмоклетъчни неоплазии, пароксизмална нощна хемоглобинурия и др.

Методи за изследване: Многопараметърна флоуцитометрия с минимум валидирана 3-цветна имунофлуоресценция (5-параметърна флоуцитометрия), 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. Флоуцитометрично 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 лекемии (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 флоуцитометрия с валидирана минимум 4-цветна имунофлуоресценция

22.2. Флоуцитометрично 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); трихолевкемия; 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, мантелноклетъчен, 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 плазмоцитна популация; да отграничава флоуцитометрично нормални от абнормни плазмоцити; 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 на 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, левкемизирали 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 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^{+} хемопоетични стволови клетки

Определяне на броя CD34^{+} хемопоетични стволови клетки в периферна кръв, костен мозък, аферезен продукт за целите на трансплантация на хемопоетични стволови клетки или кръв от пъпна връв се осъществява в имунологична лаборатория.

Показания: автоложна или алогенна трансплантация на хемопоетични стволови клетки

Методи за изследване: имунофенотипизация чрез флоуцитометрия.

24. Определяне на химеризъм след трансплантация на хемопоетични стволови клетки

Описание: С термина „химеризъм" след трансплантация на хемопоетични 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 три месечни интервали до 18-тия месец. В зависимост от кондициониращия режим, клиничното състояние на пациента и резултатите от химеризма се извършват и междинни изследвания.

Показания: алогенна трансплантация на хемопоетични стволови клетки.

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

25. Флоуцитометрично определяне на *in vitro* алерген специфична активация/дегранулация на базофили

Лабораторията по клинична имунология следва да е в състояние да определя *in vitro* алерген специфична активация/дегранулация на базофилни гранулоцити чрез флоуцитометрия.

Показания: ИгЕ-медиирани алергични заболявания.

Метод за изследване: флоуцитометрия.

26. 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.

27. 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: трансплантация на клетки, тъкани, органи.

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).

28. 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.

Методи за изследване: флоуцитометрия и др. утвърдени техники.

29. 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.

Методи за изследване: с доказана висока чувствителност като флоуцитометрия.

30. Имуноцитохимично и имунохистохимично изследване на интрануклеарни/ цитоплазмени/ мембранни антигени и/или генетични последователности.

Описание: Идентифициране и локализиране на интрануклеарни/цитоплазмени/ 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 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 микросредата, пролиферативна активност, имуноглобулини и леки вериги и др.

Показания: онкохематологични и онкологични заболявания.

Методи за изследване: микроскопска имуноцитохимия и имунохистохимия.

31. Определяне на инфекциозни повърхностни антигени или антитела в кръвен серум или плазма

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

Показания: инфекциозни заболявания.

Методи за изследване: микроскопска имуноцитохимия, имунохистохимия или хибридизация.

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

Описание: Изследване на клонални пренареждания на гените на тежки имуноглобулиниви 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.

III. ПРАВИЛА ЗА ДОБРА МЕДИЦИНСКА ПРАКТИКА ПРИ НЯКОИ ИМУНО-МЕДИИРАНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

1. Правила за добра медицинска практика за диагностика и лечение на първични имунни дефицити (ПИД)

Целта на „Правилата за добра медицинска практика за диагностика и лечение на ПИД“ 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 същество ПИД са наследствени заболявания на имунната система. Засегнатите лица са предразположени 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 1:2 000 живи раждания, поради което повечето от тях се причисляват към групата на редките заболявания. Описани са над 350 генетични нарушения, водещи до дисфункция на имунната система. 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“.

А. КЛЕТЪЧНИ ИЛИ КОМБИНИРАНИ ИМУННИ ДЕФИЦИТИ

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

ДИАГНОЗА

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

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 дисгинеза	Д81.0
		Тежък комбиниран имунодефицит с ниско съдържание на Т -и В- клетки	Д81.1
		Тежък комбиниран имунодефицит с ниско или нормално съдържание на В-клетки	Д81.2
		Дефицит на аденозиндезаминаза(ADA)	Д81.3
		Синдром на Nezelof	Д81.4
		Дефицит на пурин-нуклеозид фосфорилаза(PNP)	Д81.5
		Дефицит на главния хистокомпатибилен комплекс клас I	Д81.6
		Дефицит на главния хистокомпатибилен комплекс клас II	Д81.7
		Други комбинирани имунодефицити	Д81.8
		Комбиниран имунодефицит неуточнен	Д81.9
Синдром на Wiskott-Aldrich	WAS	Синдром на Wiskott-Aldrich	Д82.0
Синдром на Di George още познат като 22q11 делеционен синдром	Тимусна аплазия	Синдром на DiGeorge	Д82.1
Атаксия-телеангиектазия	A-T	Малкомозъчна атаксия с дефекти в възстановяването на ДНК	G11.3
		Други наследствени атаксии	G11.8

Засегнатите индивиди имат променена Т-клетъчна функция и вследствие на това също имат проблеми с производството на антитела. Тези индивиди имат както чести, така и необичайни инфекции. Обикновено пациентът е новородено или малко дете 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. Първият сигнал за 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 хемопоетични стволови клетки (ТХСК) за постигане на имунна реконституция. Ранната диагноза може да предотврати инфекциите и е животоспасяваща.

Пациентите с клетъчни или комбинирани имунни дефекти имат следните характеристики:

- изглеждат болни
- понякога имат дисморфично лице – напр. синдром на DiGeorge, ектодермална дисплазия (NEMO), синдром на Job.
- 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
    - телангиектазии - при Ataxia-telangiectasia
    - петехии - при синдром на Wiskott-Aldrich
    - липса на нокти, коса или изпотяване (NEMO)
    - кожни вирусни инфекции
    - тънка коса 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
- развиват инфекция, която не е придружена от лимфаденопатия, с изключение на синдрома на Wiskott-Aldrich
- проява на нежелани реакции след живи ваксини
- неврологични находки - "атаксия" или тетания на новороденото (синдром на DiGeorge)
- необходимо е да се изключи инфекция с HIV вируса 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, MHC клас II дефицит или дефицит на модулатора на ядрения фактор капа B (NEMO) дефицит. Клиничното разпознаване на атактсия - телангиектазия може също да се забави, тъй като признаците се развиват прогресивно през първите няколко години от живота.

При подозрение за SCID (Severe combined immunodeficiency), 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 < $3,4\times10^9$L;
- 4 – 6 месеца < $3,9\times10^9$L;
- 7 – 24 месеца < $3,4\times10^9$L;
- 3 – 6 години < $2,3\times10^9$L;
- 7 – 12 години < $1,9\times10^9$L;
- 13 – 18 години < $1,4\times10^9$L;
- възрастен < $1,0\times10^9$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, изследвани на цитокини и адхезионни молекули.

От молекулярните тестове от основно значение са генетичните и имуногенетични изследвания, изследване на химеризъм и др. Генетичното изследване се усложнява от факта, че има поне 13 различни молекулярни причини за SCID.

***Неонатален скрининг за Т клетъчна лимфопения*:** Неонаталният скрининг за тежък комбиниран имунен дефицит (SCID) и повечето други Т клетъчни нарушения се извършва рутинно в над 25 щата на САЩ и в някои Европейски страни. У нас се прави пилотно проучване, с оглед внедряването в рутинната практика. Този скрининг позволява ранна диагноза на сериозни имунни дефекти, много от които изискват лечение с ТХСКТ. Тестът използва изсушена кръвна капка на филтърна бланка, от която се извлича ДНК за анализ на Т-клетъчен рецептор посредством TRECs - Т-клетъчно рецепторни остатъчни кръгове. Ниските стойности на TRECs изискват незабавна консултация от експерт клиничен имунолог, за да се оцени нуждата от ТХСКТ. От редица други държави се очаква да добавят този тест към панела за скрининг на новороденото.

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 SCID при последващо раждане. При намаление на левкоцитите трябва да се направи флоуцитометричен анализ на Т клетъчната субпопулация. Ако Т клетките са ниски или отсъстват е необходимо да се оцени тяхната функция, за да се

потвърди диагнозата SCID. При наличие на Т клетки, трябва да се има предвид, че те могат да бъдат преминали трансплацентарно от майката или кърмачето може да има клонални клетки, както при синдрома на Ommen или други форми на "leaky SCID." И в двата случая функцията на Т-клетките ще бъде ниска.

2. Типичните сериозни, често фатални инфекции при пациенти с SCID се дължат на PJP (Пневмоцистна пневмония), Candida, RSV, вирус параинфлуенца 3, CMV, EBV и/или аденовирус. Ако се подозира, че новороденото има SCID, то трябва да се постави на профилактика за PJP с триметоприм/сулфаметоксазол.
3. Кърмачета със SCID 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, ~~или~~ жива атенюирана 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. Идвивидите 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 SCID и други пациенти с Т-клетъчен дефицит, които са трансплантирани, но не са възстановили пълна имунна компетентност или които получават имуносупресивни 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 ~~се~~ 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 имунен 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 имунен дефицит като частичен DiGeorge синдром.
8. Възстановяването на имунната система при пациенти със SCID обикновено изисква трансплантация на хемопоетични стволови клетки в началото на живота. Предтрансплантационната химиотерапия не е необходима за кърмачетата с SCID, тъй като те нямат Т клетки. Генната терапия е изпробвана със значителен успех, но има сериозни нежелани реакции. Пациентите със SCID, които са получили успешна ХСК, изискват поне едногодишно проследяване от имунолог в специализиран център.
9. Само облъчени (5000 RAD), CMV-отрицателни, делевкоцитни кръвни продукти трябва да се използват за пациента със SCID или други предполагаеми дефекти на Т-клетки.
10. Пациенти с комбинирани имунодефицити (CID) 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, няма Т клетъчна функция и трансплантацията на тимус е препоръчителното лечение.

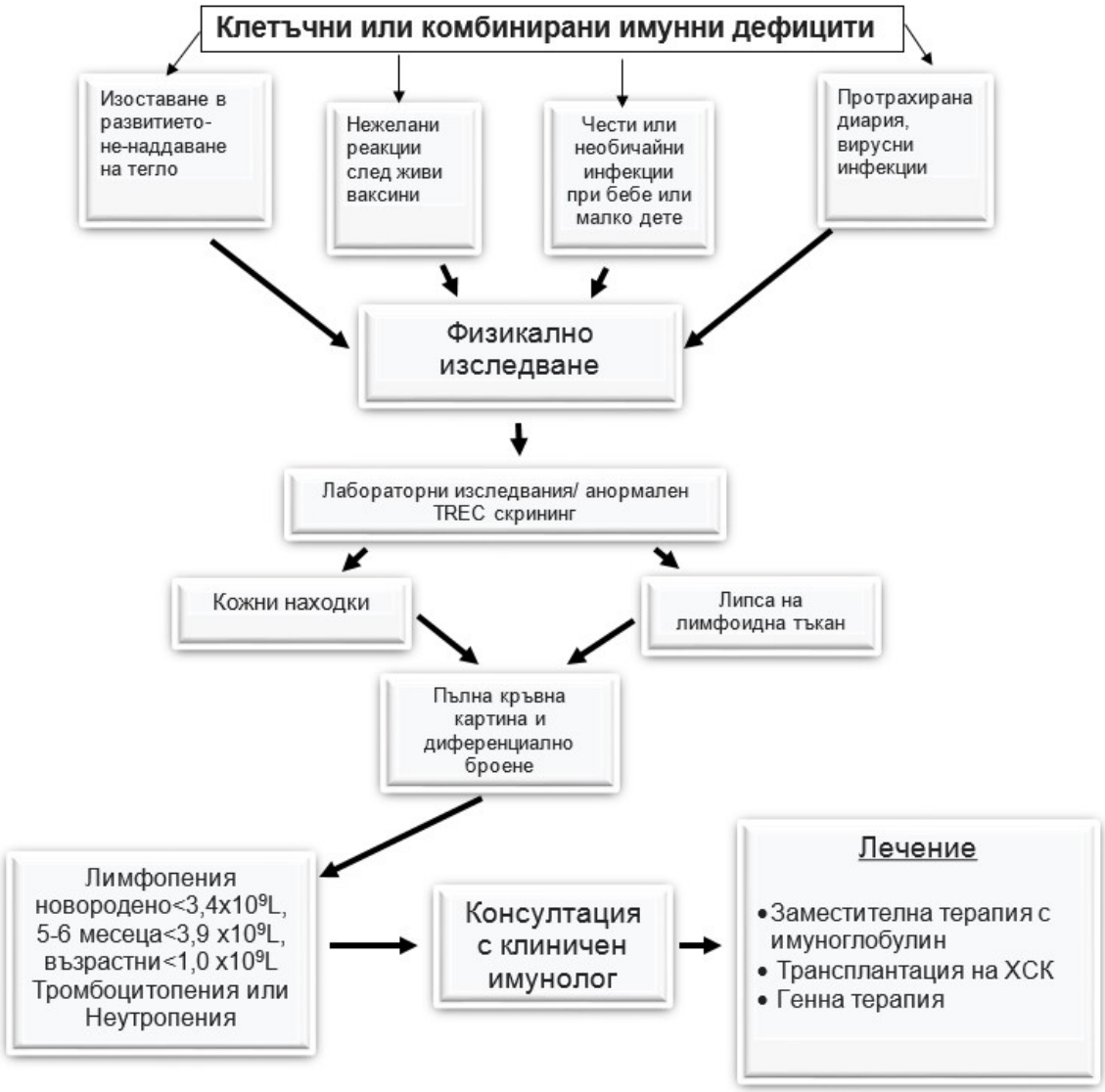
11. Дългосрочните прогнози за частичен синдром на DiGeorge обикновено са задоволителни от имунологична перспектива. Въпреки това, риска от други усложнения като забавяне на развитието, гърчове, тежко автоимунно заболяване или индуциран от EBV лимфом остава. Пациентите с Ataxia telangiectasia и пациентите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

ГЕНЕТИЧНА КОНСУЛТАЦИЯ

За много от клетъчните или комбинираните 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 гени, които, когато мутират, водят до същото клинично проявление. Например, известно е, че мутациите в един от поне тринадесет гени могат да причинят SCID. Най-честата форма на SCID 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 комбинираните 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 обаче 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 хромозомата 22, е важно да се направи молекулярно тестване на родителите на дете с това заболяване, поради възможна клинична вариабилност и евентуалин 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 имунен дефицит.



ДЕФЕКТИ В СИНТЕЗА НА АНТИТЕЛА

Систематизирането на антителните дефекти в зависимост от МКБ-10 класификацията 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 хипогамаглобулинемия	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 ИгМ синдром	Хипер ИгМ	Имунен дефицит с повишен ИгМ	D80.5
Селективен ИгА дефицит	ИгА дефицит	Селективен дефицит на ИгА	D80.2

ДИАГНОЗА

Диагностичният алгоритъм при съмнение за наличие на 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 странан, 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
- Синуити, 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), ревматологични прояви и ендокринни нарушения. Развитие на автоимунитет при пациенти с антителен дефицит може да се наблюдава при болни с ИгА дефицит и общ вариабилен имунен дефицит (Common Variable Immune Deficiency-CVID). Алергични прояви с повишаване на серумното ниво на ИгЕ могат да се наблюдават при пациенти с ИгА 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 ИгМ синдром.
- Лимфаденомегалия и спленомегалия при пациенти с CVID и автозомно рецесивен хипер ИгМ синдром
- Перфорации и белези на тъпанчевата мембрана
- Белодробна находка – хрипове и „свиркания“
- Барабанни 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 тромбоцитния 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 ИгГ, ИгА, ИгМ, ИгЕ

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 ИгА, което може да бъде определено като ниво под детекционната граница за кита. Това води до невъзможност за разграничаване на много ниско ниво на ИгА от липсващ серумен ИгА. 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 ИгГ субкласовете.

Измерване на специфични към ваксини антитела *(поствaксинален 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 поствaксиналният отговор, както срещу протеинови (тетаничен и дифтериен токсоид) така и срещу полизахаридни (пневмококови полизохориди) антигени. Пациентите могат да отговорят на тетаничен токсоид 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 кръвногруповите антигени) са нативни анти-полизахаридни антитела предимно от ИгМ 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 (Иг) заместителна терапия. Това важи особено за пациенти, които са били диагностицирани с ИгГ субкласов дефицит или с "полизахариден антителен дефицит". Тези диагнози често се основават на резултатите от измерванията на серумните ИгГ 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 интерпретабилно.

Оценката за наличие на дадена инфекция при пациенти суспектни за антителен дефицит или при тези 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 (посявка, 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 ИгА 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 ИгГ антитела, получени от донорска плазма на приблизително 10000 здрави донори на партида. Полуживотът на тези ИгГ антитела е 19-21 дни или по-дълъг при имунодефицитни пациенти, като количествата на другите имуноглобулинови класове (ИгА, ИгМ) са изключително ниски, така че те не допринасят за повишаване серумното ниво на тези протеини в пациента. Интервалът между инфузиите обикновено е 2 до 4 седмици при интравенозен начин на приложение и по-често (1 до 14 дни) при подкожно приложение, въпреки че сега има Иг препарати, които могат да се прилагат подкожно на всеки 3 до 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 мг/кг телесно тегло. "Trough" нивото на ИгГ (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 ИгГ, за да се оцени техния къмплаянс.
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 ИгГ, прицелната стойност на ИгГ ("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. Проучвания показват, че когато "Trough" нивото при възрастни пациенти с агамаглобулинемия се поддържа над 8 гр/л, се предотвратяват сериозни бактериални заболявания и ентеровирусни менингоенцефалити. По-високи прицелни нива (> 8гр/л) 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 ИгГ 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 синуити, белодробни и/или гастроинтестинални инфекции. В тези случаи е показана по-продължителна антибиотична профилактика. В случай на подобни усложнения, е необходимо 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 функции, 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 Х-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 флоуцитометрично), напр. пациенти със CVID, са изложени на риск от развитие на автоимунни 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, Х-свързана (Bruton's) агамаглобулинемия или Х-свързан хипер ИгМ 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 свръхрастеж. 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 ИгА, ИгМ и ИгЕ, 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 ИгГ и антителният отговор към ваксинални антигени може да се дължи изцяло на тези, съдържащи се в препарата, използван за терапия.
2. За по-нататъшна оценка дали пациентът може да продуцира ИгГ, се използва анализ на поствакcиналния отговор към неоантигени (към антигтени 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 антителния 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. Позитивен кожноалергични тест към даден алерген означава, че пациентът продуцира ИгЕ антитела, което не предполага необходимост от имунозаместителна терапия.

Проследяване на имуноглобулиновата терапия при пациенти с антителен дефицит

1. Честота на изследване на серумен ИгГ за "trough" ниво. Необходимо е изследване на серумното ниво на ИгГ 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 ИгГ през ГИТ и това да доведе до неочаквано ниско серумно ниво на ИгГ. 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 ежемесечно определяне на ИгГ 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 изследва 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 с CVID, особено с първична лимфаденомегалия, могат да бъдат проследени с извършване на цялостна оценка на белодробната функция, компютър томографско изследване CT, ядрено магнитен резонанс MRI 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 отговорят 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 коремен 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 имунодефецитните пациенти.
5. Към момента информацията за вредата, която BCG и ротавирусната ваксина могат да нанесат при имунизация на пациенти с хуморален имунен 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.

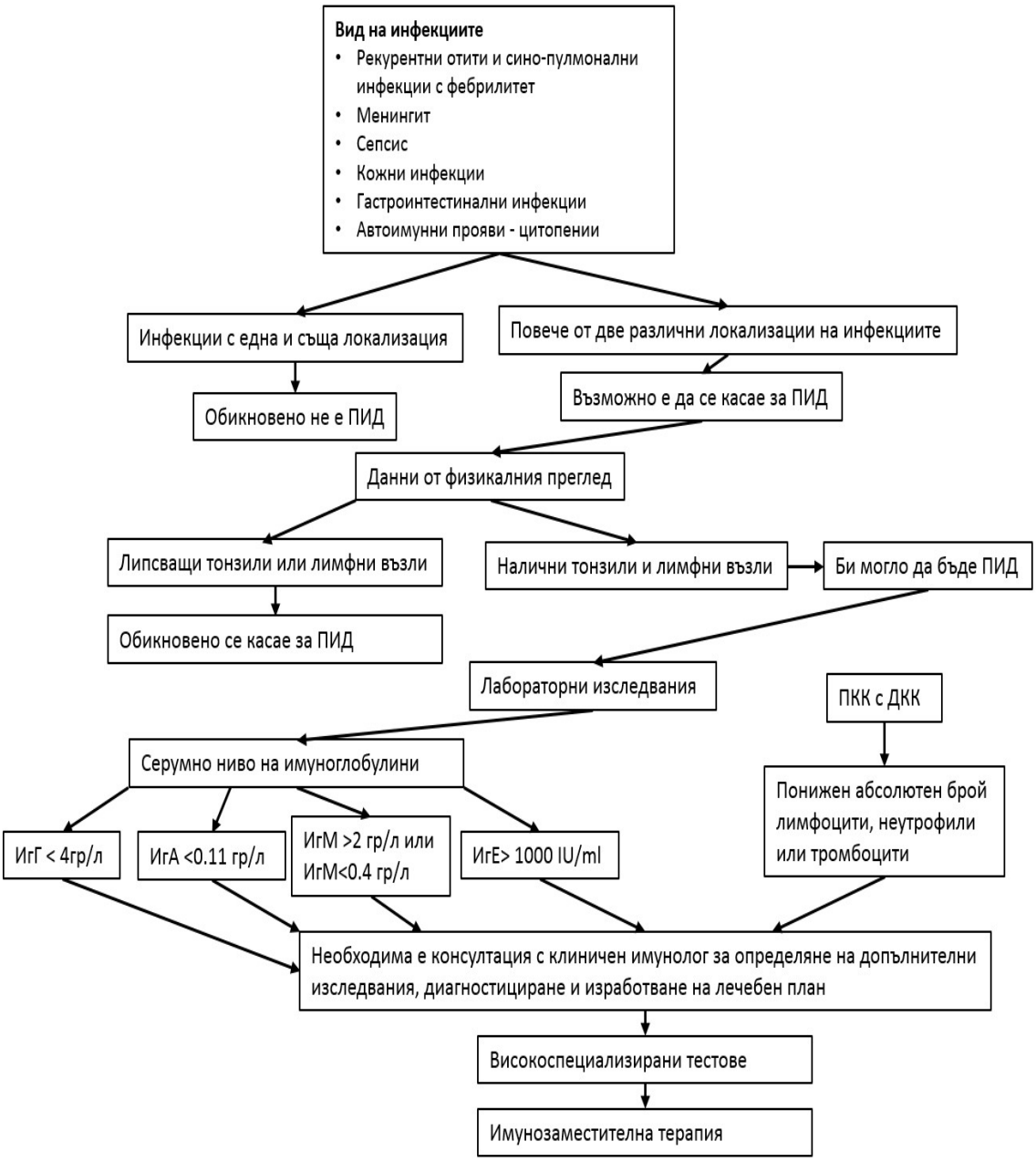
ГЕНЕТИЧНА КОНСУЛТАЦИЯ

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 ИгА дефицит, където подлежащият генетичен дефект може да се установи в по-малко от 10% от пациентите. Поради тази причина 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 ИгА 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 ИгМ синдром, са известни подлежащите генетични дефекти. Тези заболвания 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 молекулярно генетичен 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 носителки при Х-свързания начин на унаследяване. Генетично изследване на пациентите, носителите и пренатална диагностика при някои от заболяванията може да бъде извършено 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 класификацията е представено на таблица 4.

Таблица 4. Дефицити в системата на комплемента

Заболяване	**Наименование**	**МКБ10 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, некласифицирани 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 адаптивни 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 изявят с рецидивиращи пневмококови инфекции: отит, пневмония или бактериемия. Също така може да има съпътстващ антителен дефицит, вследствие на лошо улавяне на антигена от дендритните клетки, които от своя страна взаимодействат с комплекси антиген-антитяло, включващи компоненти на комплемента. 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 животозастрашаващи инфекции в ранна детска възраст (преди 2-годишна възраст), понякога последвани от имунокомплексни заболявания: респираторни бактериални инфекции, бактериемия, минингит, развитите 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 афро-американците, 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 излседвания 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 AH50. 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

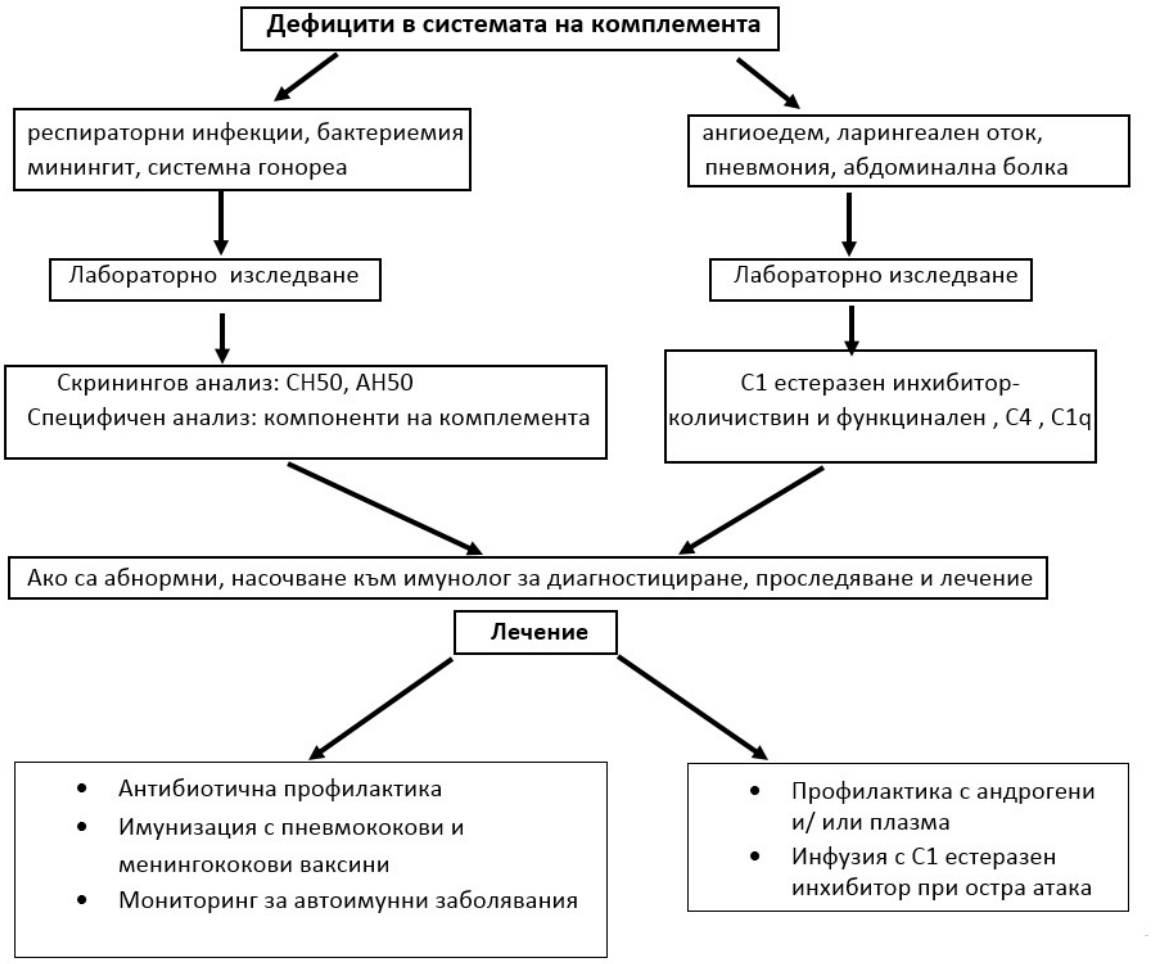
- Антибиотичната профилактика може да бъде подходяща при дефицит на всеки от компонентите в каскадата на комплемента. Менингококова ваксина и/или антибиотична профилактика е препоръчителна за всяко лице с диагноза C5 до C9 дефицит.
- Всички пациенти с комлементен дефицит трябва да бъдат имунизирани с 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 B и T 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. MBL разпознава олигозахариди и може да активира класическия път на комплемента. Въпреки това, дефицитът на MBL е

относително чест и може да промени други заболявания, като кистична фиброза. Сам по себе си няма сериозна клинична изява.

ГЕНЕТИЧНА КОНСУЛТАЦИЯ

При всички дефекти на комплементната система е известен генетичния дефект. За повечето компоненти унаследяването е автозомно-рецесивно и експресията е кодоминантна. Генетичната причина за дефицит на С1 естеразния инхибитор при наследствения ангиоедем (НАЕ) е известна. Заболяването се унаследява автозомно доминантно. Фамилната анамнезата 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 фагоцитарните дефицити в зависимост от МКБ-10 класификацията 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 дефинитивната диагноза 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 фагоцитарен дефект е представен на фигура 4.

Таблица 5. Дефекти на фагоцитите

Заболяване	**Наименование**	**МКБ10 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
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 засягят:

- **Кожа** - абсцеси (наблюдавани при хронична грануломатозна болест [CGD] и хипер имуноглобулин Е синдром [HIES]) 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** - наблюдавана 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.
- **Албинизъм** - може да се открие при синдрома на Chediak-Higashi.

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 химиотаксис) 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 неутрофилите) трябва да бъде повтарян последователно (например 2 пъти седмично в продължение на 1 месец).
- Определяне на CD11/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/сулфаметоксизол) 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 неутропении. Хората с тежка форма на неутропения (например синдромът на Kostmann) отговарят добре на терапия с гранулоцит колони-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, СУЕ и/или CRP и образна диагностика на гръдния кош редовно се извършва при CGD. Ако има треска, неразположение или промяна в здравния 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 тестовете 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 фагоцитарен дефицит, нямат противопоказания за ваксинриане и се препоръчват всички ваксини за възрастта. Пациентите със CGD или други фагоцитни клетъчни нарушения могат да посещават училище и обществени места като молове.

ГЕНЕТИЧНА КОНСУЛТАЦИЯ

Генетичната причина е известна за повечето от фагоцитните имунни дефицити. Въпреки това, както при SCID, мутациите в няколко различни гени 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 автозомно рецесивно наследяване. 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 за фагоцитните клетъчни имунни дефекти е в специализирани лаборатории.

Е. <u>МЕНДЕЛОВА ПРЕДРАЗПОЛОЖЕНОСТ КЪМ МИКОБАКТЕРИАЛНА БОЛЕСТ(MSMD)</u>

Систематизирането на клетъчните дефекти в зависимост от МКБ-10 класификацията 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 при всяка възраст в 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, Mycobacteriumm 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-ɣ /IL12.

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

Заболяване	**Наименование**	**Описаниепо 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 β1 deficiency	IL12B1	Генетични аномалии на левкоцити	D72.0
Signal transducer and activator of transcription 1 deficiency	STAT1	Генетични аномалии на левкоцити	D72.0
NF-κB essential modulator deficiency	NEMO	Комбинирани имунни дефицити, неизяснени	D81.9
IKKβ deficiency	IKKβ	Комбинирани имунни дефицити, неизяснени	D81.9
NF-κB inhibitor	IκBa	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
GATA binding protein 2 deficiency	GATA2	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 IFNγR1, IL-12Rβ1, 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

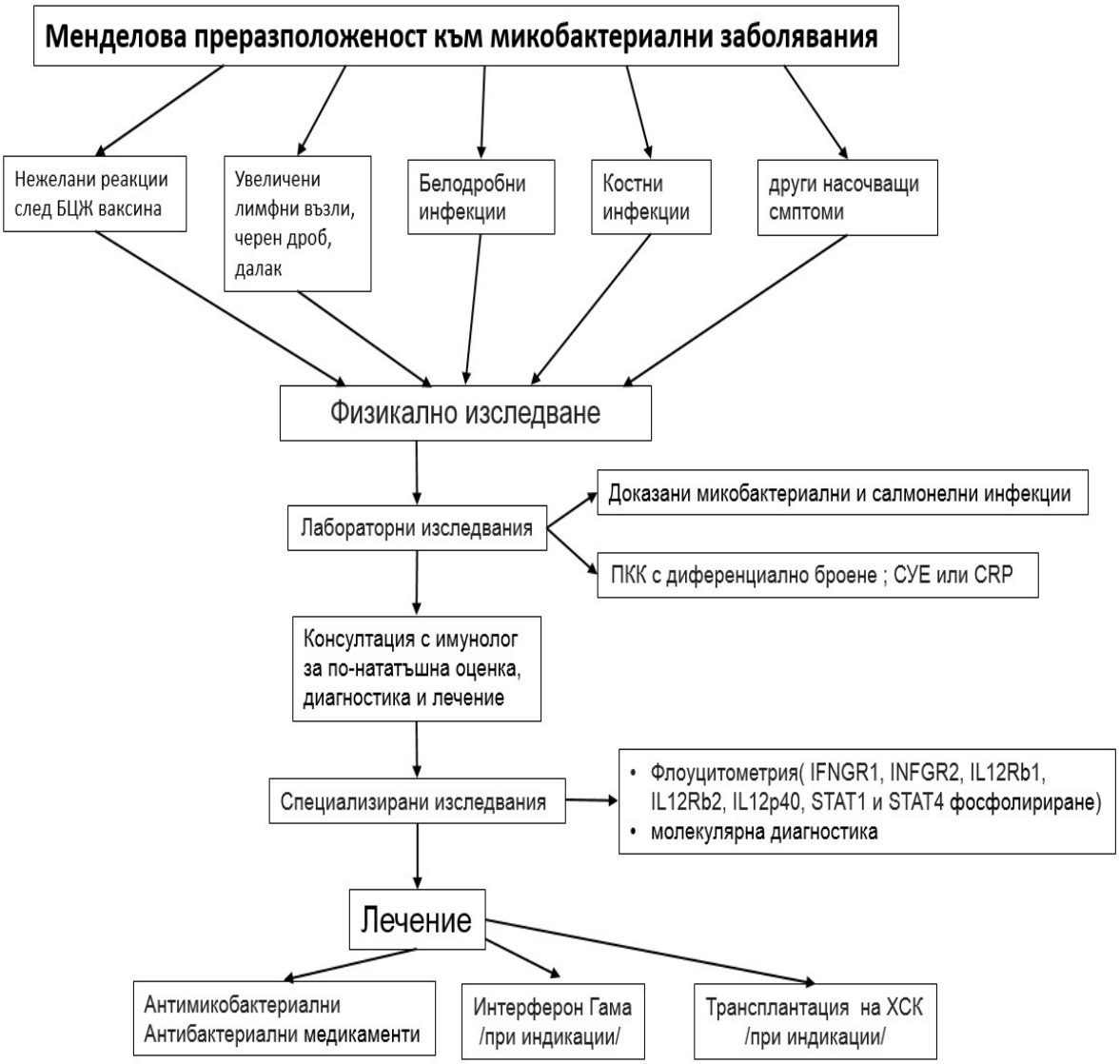
помогнат да се определи дали микобактериите присъстват и са живи. Образни изследвания (ултразвук, СТ, ЯМР) и лабораторни маркери на възпаление (левкоцитоза, СУЕ, ЦРП) също се прилагат за проследяване на пациентите.

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.

ГЕНЕТИЧНА КОНСУЛТАЦИЯ

Генетичните дефекти, свързани с MSMD, могат да се унаследяват като Х-свързани (напр, NEMO defects), автозомно рецесивни (AR) (напр, IFNγR1, IFNγR2, IL-12p40, IKKβ, IRF8, ISG15, STAT1 и IL-12Rβ1) или автозомно доминантни (AD) (напр.IFNγR1, IFNγR2, STAT1, IRF8, IkBa and GATA2). 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 предрзположеност към микобактериални заболявания.



F. ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ИМУННА ДИСРЕГУЛАЦИЯ

Систематизирането на заболяванията на имунна дисрегулация в зависимост от МКБ-10 класификацията е представено на таблица 7.

Таблица 7. Заболявания на имунна дисрегулация съгласно МКБ-10 класификация

Заболяване	**Описаниепо МКВ 10**	**МКВ 10 Код**
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
Фамилна хемофагоцитна лимфохистиоцитоза (FHL)	Хемофагоцитна лимфохистиоцитоза	**D76.1**
Х-свързан лимфопролиферативен синдром (XLP).	Имунодефицит като резултат от наследствен дефект, предизвикан от вируса на Epstein-Barr Свързана с Х-хромозомата лимфопролиферативна болест	D82.3
Автоимунен лимфопролиферативен синдром (ALPS).	Новообразувание с неопределен или неизвестен характер на лимфната, кръвотворната и сродните им тъкани, неуточнено	*D47.9*
Автоимунна полиендокринопатия - кандидоза - ектодермална дисплазия (APECED).	Автоимунна полигландуларна недостатъчност	**E31.0**
Имунодефицит, Полиендокринопатия, Х-свързан синдром (IPEX).	Автоимунна полигландуларна недостатъчност	**E31.0**

ДИАГНОЗА

Общият подход за оценка и диагностика на нарушения на имунната дисрегулация са обобщени на фигура 6.

1. Подозира се нарушение на имунната дисрегулация при наличие на 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. Дали пациентът има остра или фулминантна форма с висока температура, интоксикиран външен вид и признаци на лимфопролиферация? Алтернативно, ако представянето е подостро или хронично, налице ли са характеристики на рецидивиращи инфекции и аномалии в пигментацията?

3. Всяко от изброените в т. 2 е в съответствие с форма на HLH, или FHL, или в асоциация (като „ускорена фаза“) с друг синдром, като CHS, GS или HPS.

4. Изявени ли са в клиничното представяне лимфопролиферация и автоимунно заболяване? Ако да, предполага се ALPS, свързани с ALPS нарушения, или XLP.

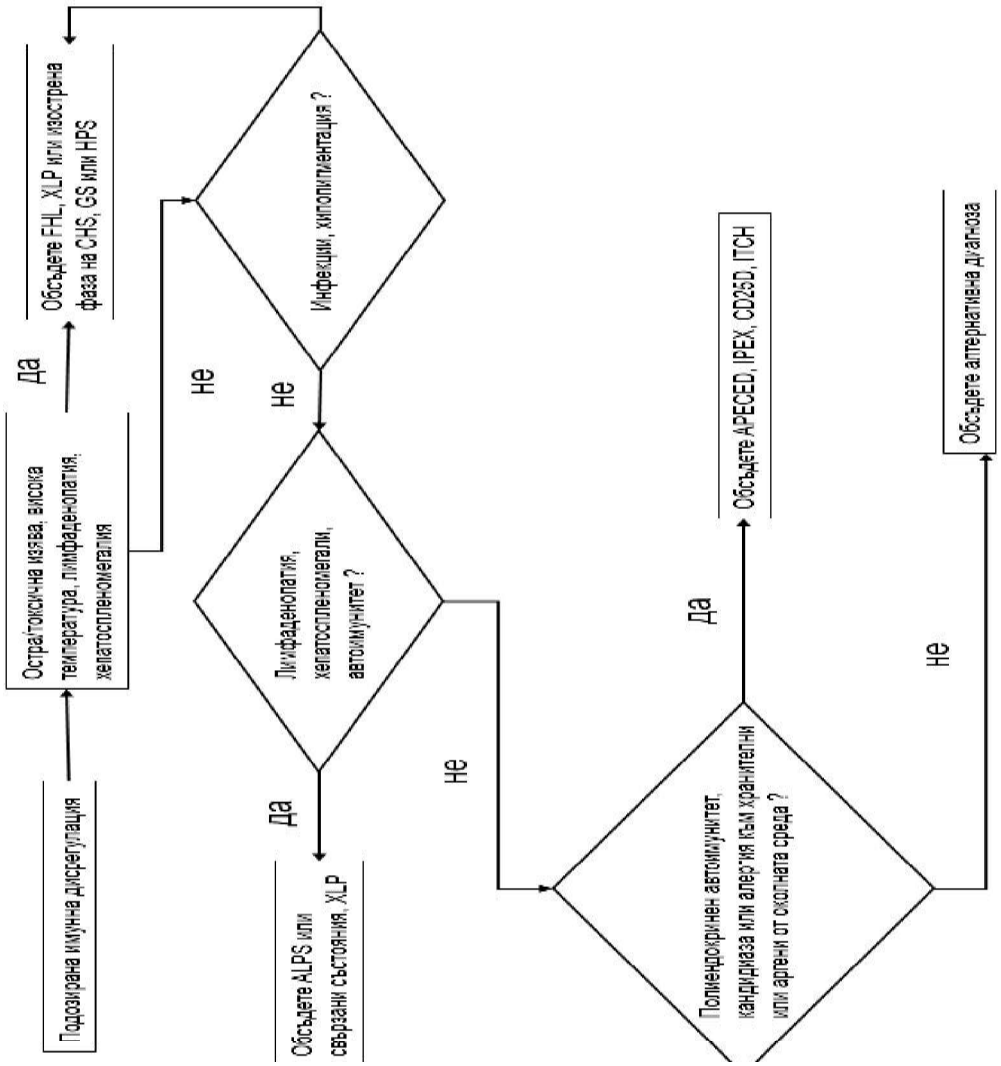
5. При наличие на: (а) полиендокринен автоимунитет; (б) CMCC; или (в) многобройни хранителни алергии и/или алергии към фактори на околната среда е възможно наличието на APECED, IPEX или дефекти на CD25 или ITCH.

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 с CHC 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.

Фигура 6. Диагностичен алгоритъм при съмнение за имунодисрегулационен синдром



Съкращения: FHL - фамилна хистиолимфоцитоза; XLP - Х-свързан лимфопролиферативен синдром; CHS - Синдром на Chediak-Higashi; GS - Синдром на Griscelli; HPS - Синдром на Hermansky-Pudlak; ALPS - Автоимунен лимфопролиферативен синдром; APECED - Автоимунна полиендокринопатия-кандидоза-ектодермална дисплазия; IPEX- Имунодефицит, полиендокринопатия, Х-свързан; ITCH - itchy E3 убиквитин протеин лигаза

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 рецидивиращи 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.

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 автозомно 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) хиперферритинемия над 500 mg / L; и (8) повишено ниво на разтворим CD25 (IL-2 рецепторна верига) над 2400 U/mL.

Лимфопролиферативни синдроми. Х-свързан лимфопролиферативен синдром (XLP).

Трябва да се подозира при момчета с фулминантна инфекциозна мононуклеоза с HLH, лимфоми и дисгамаглобулинемия. 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% изявяват дисгамаглобулинемия. Началото на симптоматичното заболяване може да бъде най-рано към 5-ти месец или в по-късна зряла възраст. При пациенти с XLP2, HLH е по-лек, дисгамаглобулинемията 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 хипогамаглобулинемия на един или повече подкласове IgG или повишени нива на IgA и IgM. След EBV инфекция може да има хипогамаглобулинемия с нарушено производство на специфични антитела, инвертно съотношение CD4/CD8 (причинено от експанзия на CD8+ клетки), и намалени Т-клетъчни пролиферативни отговори към митогении 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 хипогамаглобулинемия, 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 хиперспленизма. 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% до 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, кодирщ Fas лиганда (TNFSF6, <1% от пациентите) и каспаза 10 (CASP10; 2% до 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 CD31TCRab1CD42CD82 двойно-отрицателни Т-клетки (> 1.5% от общите лимфоцити или 2,5% от CD31 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 pg / mL), повишени плазмени нива на IL-10 (> 20 pg / mL), повишени серумни или плазмени нива на витамин B12 (> 1500 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 фамилна анамнеза.

Автоимунна полиендокринопатия-кандидоза-ектодермална дисплазия (APECED). APECED трябва да се подозира при пациенти с имуно-медиирана деструкция на ендокринната тъкан, хронична кандидоза и ектодермална дистрофия. APECED, известен също като автоимунен полигландуларен синдром тип 1 (APS1), е автозомно рецесивно заболяване 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 в иранските евреи, които носят мутацията Y85C. Ендокринопатията е имуномедиирана, като хипопаратиреоидизмът и надбъбречната недостатъчност са най-разпространени. Други автоимунни прояви са алопеция ареата, полова 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 тимоми трябва да бъдат наблюдавани за развитието на CMCC, която може да възникне при наличие на автоантителата анти-IL-17A, анти-IL-17F и анти-IL-22.

IPEX (Имунодефицит, Полиендокринопатия, Х-свързан) **синдром.** Трябва да се подозира при пациенти с тежък ентерит и хранителна алергия, инфантилен диабет или тиреоидит и екзема. Синдромът на 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.

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 в всички гранулирани клетки, включително хематопоетични 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 наличие на 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 флоуцитометрия самостоятелно или в комбинация с функционални клетъчни тестове. Оценява се вътреклетъчен перфорин, свързан с SLAM протеин (SAP) и Х-свързан инхибитор на апоптоза, както и модифициран функционален тест за NK/T клетъчна цитотоксичност на базата на откриване на CD107a (лизозомно-свързанмембранен протеин 1). Като цяло, появата на дегранулация при повече от 5% от почиващите си НК клетки е с 96% чувствителност и 88% специфичност в полза на първичните FHL.

FHL 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 диагноза XLP2.

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

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 диагноза XLP2.

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

Измерване на Т клетки, експресиращи алфа/бета Т-клетъчен рецептор (TCR), без CD4 или CD8 е първият скринингов тест за ALPS. CD3-CD4-CD8- двойно-негативни 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 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 или генетичен анализ на FOXP3 гена.

МЕНИДЖМЪНТ И ДЪЛГОСРОЧНО НАБЛЮДЕНИЕ

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, ревматологични 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 имуносупресия, IVIG, лечение на инфекциозните усложнения и компенсиране на ендокринопатиите, лечение на усложненията от страна на гастроинтестиналния тракт, спленектомия.

HLH трябва да се лекува с високи дози глюкокортикостероиди, химиотерапевтични и други имуносупресори 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 асимптоматични 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) успешно 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 антибиотичната 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 до 10% от пациентите с ALPS.

При пациенти с APECED трябва да се прилага имуносупресивна 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 хормоно-заместителна 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 класификацията е представено на таблица 8.

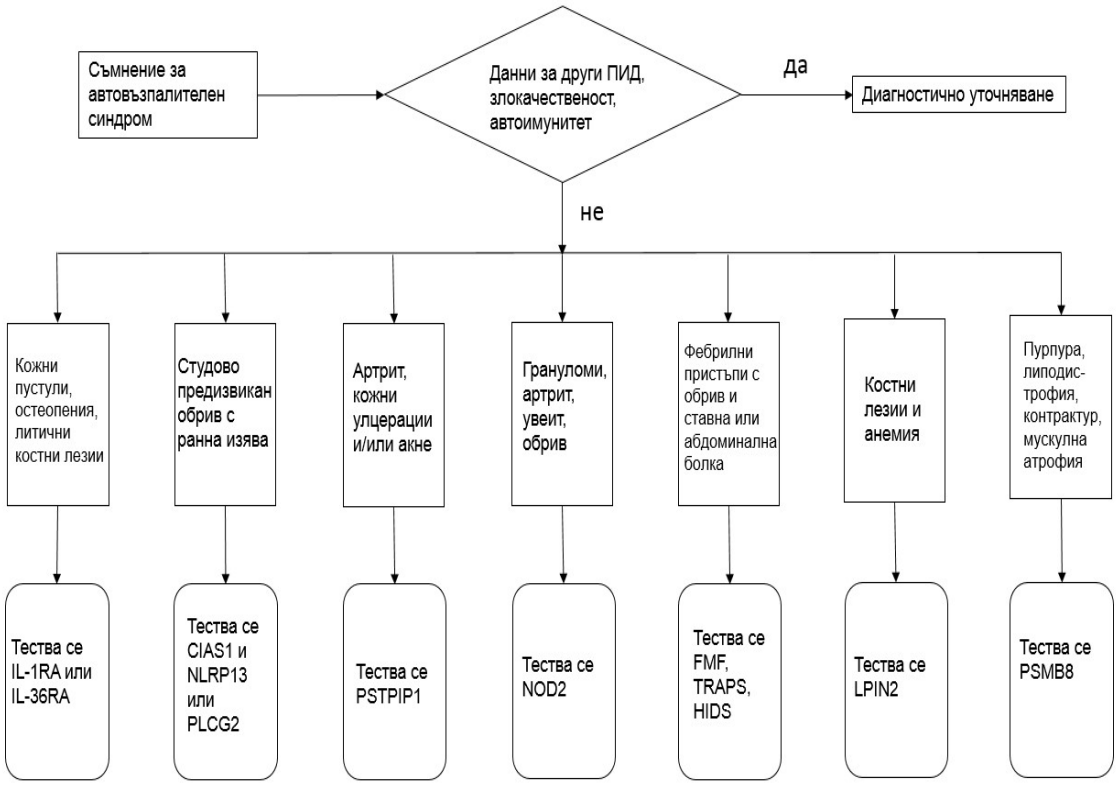
ДИАГНОЗА

Автовъзпалителните нарушения са група синдроми, отличаващи се с повтарящи се пристъпи на възпаление, без характеристики на автоимунитет (т.е. без автоантитела или автореактивна 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 фигура 7.

Таблица 8. Автовъзпалителни нарушения съгласно МКБ-10 класификация

Заболяване	**Описаниепо МКВ 10**	**МКВ 10 Код**
Криопирин асоцииран периодичен сндром.	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*
Синдромът 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. Когато са налице повтарящи се пристъпи на треска или възпаление, като например повишена скорост на утаяване на еритроцитите (СУЕ) или ниво на СРП, 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. Това е от съществено значение за изключване на други причини за повтарящи се трески или повтарящо се/продължаващо възпаление. На първо място е внимателната оценка за злокачествени заболявания, рецидивиращи инфекции и автоимунитет. Измерванията на нивата на СУЕ и СРП 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 наистина епизодичен. Необходимо е да се има в предвид, че неспецифичните автоантитела (напр. антинуклеарни антитела, ревматоиден фактор, анти-двуверижни ДНК антитела, анти-фосфолипидни и анти-неутрофилно цитоплазмени) могат понякога да се установят леко или умерено повишени, особено при пациенти с неинфламазомни 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); Синдром на Muckle-Wells (MWS) и фамилният студов автоинфламаторен синдром (FCAS) 1 представляват спектър на заболявания, характеризиращи 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 (липсва едем и белези на мастоцитна пролиферация и дегранулация), 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, е 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 рецидивиращи 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 с 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 Blau, водят до спонтанно активиране на NOD2 протеин, активиране на NF-kB и продуциране на провъзпалителни цитокини. Ставната симптоматика при пациенти със синдром на Blau 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 Blau е еритемо-макулопапулозен, с лихеноподобни папули или е подобен на еритема нодозум. Проби от биопсия показват не-казеифициращи грануломи. По-рядко се наблюдава 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 няколко седмици 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/марестрин. 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 еврейските, арменските 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 други симптоми обикновено се развиват. 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 /mm3). 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, миалгия, 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 изопреноиди. Мутации в MVK генът е свързан 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 е характерно 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 ролята на IL-1beta 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 рецидивиращи 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 рецидивиращ 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 посявки на кожните лезии и ставите са стерилни.

Протеазомна каталитична субединица b тип 8 (PSMB8 ген) и дефекти на трансмембранния 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 пациентите 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, 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 *(**P**eriodic **F**ever)*, афтозен стоматит *(**A**phthous stomatitis)*, фарингит *(**P**haryngitis)* и увеличени лимфни възли *(**A**denitis)*. 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 ДАГНОСТИЧНИ 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 ЦРП 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 изключва сепсис, неонатални инфекции и вродена (токсоплазма, рубеола, цитомегаловирус и херпес тип 2) инфекции.

Диференциална диагноза се прави и с юношески идиопатичнен системен артрит. Анализ на последователността на NLRP3 гена потвърждава диагнозата. Блокиране на IL-1 с анакинра, рилонасепт или канакинумаб може да помогне диагностицирането.

Лабораторните аномалии при пациенти с DIRA обикновено отразяват реакцията на острата фаза с повишени нива на СУЕ и СРП, 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 СРП. 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, СРП, 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 пациентите 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 европеиден 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 про-възпалителните цитокини (INF-гама, IL-6 и TNF-алфа) се повишават 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. В последствие 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 заболеваемост, като загуба на слуха, ставни деформация 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 семействата 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 също се използват 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 телесно 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 били 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 краткотрайни курсове на преднизон е възможно да бъдат ефективни. За по-тежко протичане се предпочита етанерцепт, който намалява симптомите на възпаление в зависимост от дозата, без гаранция за трайна ефикасност. Да се има в 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-a и IL-1b. 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 PAPA 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-a (etanercep) и инфликсимаб.

Протеазомна каталитична субединица b тип 8 (PSMB8 ген)и дефекти на трансмембранния протеин 173 (TMEM173; стимулатор на интерферон). При пациенти с PSMB8 или TMEM173 трябва да се опитат различни противовъзпалителни модулатори: стероиди; инхибитори на TNF-a, 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 дизеритропоетична 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 интервалът 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-1b 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.

ИЗТОЧНИЦИ:

Immune Deficiency Foundation Diagnostic & Clinical Care Guidelines for Primary Immunodeficiency Diseases, ed. R. H. Buckley, 3d edition, 2015.

Bonilla F.A. et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency, J Allergy Clin Immunol, November 2015.

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 ~~постъпателно~~ последователно с цел потвърждение, доизясняване или диференциална диагноза на суспектното 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 (АНА) е високо чувствително за диагнозата на системен лупус еритематозус и лекарствено индуциран лупус - над 95 % от болните със заболяването са положителни, но АНА се срещат и при други автоимунни болести като автоимунен хепатит, васкулити, подостър бактериален ендокардит, HIV-инфекция, карциноми, болни със силиконови имплантати, 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 АНА, определен спрямо критериите на ICAP (International consensus of ANA pattern) би могъл да насочи към изследване на характерни АНА специфичности. Болни, които показват положителен резултат за АНА 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 обикновенно са свързани с някои проявления на СЛЕ като неонатален лупус, вроден сърдечен блок, субакутен кожен лупус, левкопения. Наличие на анти-фосфолипидни антитела, като лупусен антикоагулант (LA), антикардиолипинови антитела (ACL) и анти-β2-гликопротеин I антитела (β2GPI) 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 евДНА, 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 невролупус. Антителата срещу хистони и евДНК, 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 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, СРП

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 в бременната майка предоставя възможност за избягване раждането на сериозно увреден плод.

2. Синдром на Сьогрен

Синдромът на Сьогрен (СС) представлява бавно прогресиращо автоимунно 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 епителa на белия дроб и бъбреците, кожен васкулит, периферна невропатия и гломерулонефрит.

АНА, изследвани чрез индиректна имунофлоуресценция 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 АНА 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 при 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 ревма- фактор, 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 автоимунно заболяване, което засяга около 0.8 - 1% от населението на света. Характеризира с хронично възпаление на синовията, водещо до прогресивна и необратима ставна деструкция. Необходимостта от бързо поставяне на диагнозата и последваща терапия на заболяването с цел намаляване на 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 автоантитела, но с най-голямо значение са ревматоидните фактори (ИгМ-RF, ИгА-RF и ИгГ-RF) и антителата срещу цитрулинирани пептиди. За диагнозата на РА обичайно се използва ИгМ-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 ИгМ-RF е 69%, а специфичността - 85%. Титърът на IgM-RF може да бъде повишен и при различни други заболявания: сифилис, саркоидоза, инфекциозен ендокардит, туберкулоза, лепра и паразитни заболявания, напреднала възраст, автоимунни заболявания, а също и в 3- 5% от здравата популация. Това намалява неговата диагностична специфичност. Важен е и фактът, че ИгМ- 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 ИгМ, ИгГ, ИгА с което се повишава чувствителността и информативната стойност на теста.

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

АСРА се приемат за високо- специфични (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 допринасят 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-ССР или анти-MCV с RF увеличават 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 ИгМ-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-ССР 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 АНА, антифосфолипидни антитела, АНЦА (антинеутрофил цитоплазмени антитела). Установяват се с различна честота – между 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 имунофлоуресценция, използваща HEp-2 клетки,

установява АНА или в някои случаи анти-цитоплазмени антитела. След този скрийнингов метод е важно да се определят конкретната антигенна специфичност на антителата. Миозит-свързаните антитела се разделят на две групи – миозит-специфични антитела (МСАТ) и миозит-асоциирани антитела (МААТ). МСАТ са специфични за АМ и са представени в таблица 10.

МААТ не са специфични за АМ, установяват се и при други системни заболявания с 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 TIF1γ и NXP-2 и 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-TIF1γ	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 на ръце, предмишници, по-малко на 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 Сьогрен
- 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 анти-нуклеарни антитета. Наред с тях се наблюдават и антитела, насочени срещу цитоплазмени структури. Част от автоантителата използвани в диагностиката на Системната склероза са показани в таблица 11.

Таблица 11 . Диагностично значими автоантитела при Системна склероза

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

С по-ниска честота се срещат и други автоантитела като такива срещу 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. Част от тях са характерни за overlap синдромите с участието на системна склероза, а други са пряко ангажирани в имунопатогенезата на заболяването.

6. Първични АНЦА-асоциирани васкулити

АНЦА асоциирани васкулити са група васкулити, некротизиращи по своя характер, които засягат малките и средните по размер съдове и протичат с разнообразни органни прояви. Тук се включват грануломатозата на Вегенер, микроскопичният полиангиит и синдрома на Churge-Srauss. Основното имунологично изследване е наличие и серумни нива на АНЦА. Честотата и резултатите от изследването се показани на Таблица 12.

Таблица 12. Честота на основните видове АНЦА при АНЦА- асоциираните васкулити

АНЦА	Основен антиген	АНЦА асоциирани васкулити	Честота
cАНЦА	Протеиназа 3 (PR3)	Грануломатоза на Wegener Микроскопичен полиангиит Синдром на Churg-Strauss	75% 40% 10%
pАНЦА	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 (pАНЦА, атипична pАНЦА, cАНЦА, xАНЦА) с различни клинични асоциации. cАНЦА най-често се асоциират с грануломатоза на Wegener, микроскопски полиангиит и Churg-Strauss синдром. pАНЦА 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 АНЦА, важни за откриване на васкулити са Pr3 и MPO**.** Анти-протеиназа 3 са с висока специфичност за грануломатоза на Wegener, докато анти-миелопероксидаза 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 имуномедиирана васкулопатия, протичаща с рекурентни съдови тромбози, спонтанни аборти и тромбоцитопения, и асоциирани с постоянно повишени нива на анти-фосфолипидни антитела и тяхни белтъчни ко-фактори.
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 автоимунно заболяване, най-често системен лупус еритематодес. От групата „антифосфолипидни антитела" рутинно в имуннологичната диагностика се използват анти-кардиолипинови антитела, антитела срещу β2GPI, 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 перферните стави. Възпалението обхваща инсерциите на сухожилията и лигаментите на костта. Ентезитът е ключова характеристика. Към тази група принадлежат анкилозиращият спондилит, псориатричният артрит, синдромът на Reiter и артритът, асоцииран с интестинални чревни заболявания (IBD). Имунологичните изследвания по правило показват отсъствие в серума на АНА, ревмафактори или антитела срещу циклични цитрулинирани пептиди. За сметка на това спондилоартропатиите имат подчертана асоциация с генетичния маркер от HLA системата – HLA-B27, изследването на които може да подпомогне диагнозата.

С. ДИАГНОСТИЧНИ ИМУНОЛОГИЧНИ ПОДХОДИ ПРИ ОРГАН-СПЕЦИФИЧНИ АВТОИМУННИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

1. Автоимунен гастрит и пернициозна анемия

Автоимунният гастрит е хронично възпалително заболяване на стомаха, асоциирано с антитела към париеталните клетки и интринзик-фактора (IF). При недостиг на витамин B12 вследствие на нарушената му резорбция, поради антитела срещи IF, се развива пернициозна анемия и неврологични симптоми.

Изследването на автоантитела срещу стомашни париетални клетки показва, че 60%-90% от пациентите с пернициозна анемия имат анти-париетолоклетъчни 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 глутеновата ентеропатия е хронично автоимунно 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 анти-ендомизиумни-антитела клас ИгА. Тестът анти-tTG е с висока диагностична чувствителност (над 90%) и специфичност (над 95%). Той се провежда преди пациентът да е започнал безглутенова диета. В противен случай резултатът може да е фалшиво-отрицателен. Тестът

може да бъде фалшиво-отрицателен и при пациенти с дефицит на ИгА, поради което се трябва да се изследва и нивото на ИгА.

Нова генерация серологични тестове, използващи глиадинов или синтетичен деамидиран глиадин (анти-DGP- ИгГ), навлизат в практиката, но не се знае дали ще са по-информативни от сега използваните. Предимството на анти-DGP ИгГ е, че може да се използва като тест на пръв избор и при лица с неизвестен ИгА дефицит. Наред със споментатите антитела се изследвати и анти-глиадинови от глас ИгА, които при деца имат добра чувствителност. Наличието и величината на серумните серологични тестове се повлияват много ефективно от безглутеновата 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 безглутенова 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)

Представляват 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 АНЦА (образът е на рАНЦА или атипични рАНЦА и тези антитела са по-типични за улцерозния колит) и антителата срещу Saccharomices cerevisiae – ASCA (по типични при болест на Крон). Други описани антитела насочени срещу различни бактериални микроорганизми са анти-OmpC (Esherihia 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 автоимунен хепатит

Автоимунният хепатит (АИХ) е хронично, прогресиращо, възпалително, чернодробно заболяване. Характерните му особености са флуктуиращ ход на заболяването, интерфейс хепатит при хистологичното изследване, хипергамоглобулимеия 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 класическия тип АИХ тип I. Той се асоциира с наличието на АНА 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 рАНЦА. 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.

Таблица 13 . Типични автоантитела при различни форми на автоимунен хепатит

Тип	Автоантитела
АИХ – тип I “Класически”	Антинуклеарни Анти-гладкомускулни Анти-актинови АНЦА
АИХ –тип II	Анти-LKM-1 (*cytochrome P4502D6)* Анти-liver cytosol-1 (LC-1)
АИХ –тип III	Анти- SLA/ LP
Overlap синдром	Анти-митохондриални Анти-нуклеарни Анти-гладкомускулни Анти-карбон анхидраза II

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-М2. Те реагират със субединици на 2 оксо-киселия-дехидрогеназен комплекс (2-OADC) и в повечето случаи разпознават Е2 субединицата на пируват дехидрогеназата (PDH-E2). АМА/анти-М2 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-М4, анти – М8) 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 АНА за ПБЦ - антитела срещу нуклеарни точки точки (sp100), ядрената мембрана (gp210) или центромерите (Табл. 14). Болестно-специфичните АНА (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 АНА 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 с наличие на Sicca синдром. Асоцииране на АМА с хомогенни АНА, 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 ИгГ.

Голямо предимство на диагностичните имунологични тестове за АМА, анти-М2 и ПБЦ специфичните АНА 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 ИгМ.

Таблица 14. Автоантитела при ПБЦ

Автоантитела	Автоантигени
AMA- M2	M2 антиген е главния компонент (74 кDa) на E2 компонента на пируватгехидрогеназния комплекс.
M2-3E (BPO)	Фузионен протеин от имуногенния домейн на E2 субединицата на триензимния комплекс (3E), представляващи главния автоантиген на M2 антигена(BPO, branched chain 2-oxo-acid dehydrogenase complex)
Sp 100	Нуклеарен антиген (100 кDa) е съставна част на NB (nuclear body), представящ се с характерна „multiple dot", флуоресцентен образ на AHA-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 гликопртеин, който чрез ИИФ върху HEp2 клетки се визуализира като мембранен "rim pattern" образ на AHA.

6. Автоимунни тиреоидни болести

Автоимунни тиреоидните болести (автоимунни тиреоидити) са най-честите орган – специфични заболявания, при които в резултат на автоимунен, възпалително инфилтративен и/или деструктивен процес се увреждa 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 (Тг) като туморен маркер поради това,че ниско позитивни ТАТ могат да интерферират с Тг, в резултат на което може да има фалшиво нисък или висок резултат за Тг.

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 бременноста 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 ИгГ антитела и може да предизвикат транзиторна тиреоидна дисфункция на новороденото, което налага изследването им във втори - трети триместър на бременността на майката с тиретоксикоза и след раждането на детето. Позитивирането на TRAb носи риск от изява на тиреоид асоциирана офталмопатия (ТАО) и е неблагоприятен показател за прилагане на радиойодлечение.

7. Захарен диабет тип I

Автоимунният захарен диабет тип 1 (АЗД-1) най-често е полигенно, орган-специфично заболяване, при което поради клетъчно-медиирана 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 анти-инсулинови антитела (IAA), които се намират в над 50% от ново-диагностицираните 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 годишнеа 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 новозаболелите 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 на изява на диабета, не търпят особена динамика в хода на заболяването, по-често се намират при женския пол, не се влияят от наличието на инсулиново лечение.

Анти-IA2/ IA2β автоантителата се установяват при новодиагностициран захарен диабет, съответно IA2 антитела при 55-75% и анти IA2β – 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 заболелите на 16-18г, 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 две годишна възраст и оформят плато в динамиката на честотата след това, като IAA прогресивно намаляват след 5 годишна възраст. Индивидуалната прогностичната 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 не свързан 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- АХ-Р). 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-Р антителата. Свързващи АХ-Р антитела понякога са повишени и при пациенти със СЛЕ, възпалителна невропатия, РА и в 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-Р-свързващи антитела при пациенти с клинични признаци, потвърждава диагнозата на МГ, но нормални концентрации на антитялото не изключват диагнозата

Отрицателните серуми за анти-АХ-Р от болни с клинични белези за МГ следва да се тестират 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-Р антитела. При пациенти с тимом (около 15% от болните с МГ) в около 75-80% се наблюдават и антитела срещу антигени на напречно набразденатa мускулатура (титин, миозин, актин и рианодин-рецептор). Наличието 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, което прогресира за период от дни до четири седмици. Автоантитела, за които е установена роля, са представени в табл. 15.

Таблица 15. Автоантитела при синдром на Guillain-Barre

Клинична проява	Анти- ганглиозидни антитела	честота
Остра моторно аксонална невропатия	GM1 GM1b GD1a GalNac-GD1a	64% 66% 45% 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 енцафалити 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**
<u>*Към ядрото на неврона:*</u> ANNA1(Hu),ANNA2 (Ri), ANNA3	<u>*Йонотропни канали и рецептори*</u> AChR, NMDAR(NR1, NR2), AMPAR(GluR1, GluR2), калциеви канали, GlyR-α1	<u>*Синаптични протеини*</u>: LGI1
<u>*Към цитоплазмата на неврони и мускулни клетки:*</u> Yo(PCA1) , Tr, PCA2, Ta(Ma2), Ma1, Zica, Gephrin, CARP8, ENO1, titin, GAD, Amphyphysin	<u>*Метаботропни канали и рецептори*</u> D1, D2, GABAbR1, mGluR1, mGluR5	
<u>*Към глията:*</u> CV-2, Bergman (Sox-1), ENO1	<u>*Други мембранни структури*</u> 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).

Табл. 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
AMPAR	Лимбичен енцефалит	дребноклетъчен белодробен карцином, млечна жлеза, тимом
GAMAbR	Лимбичен енцефалит	дребноклетъчен белодробен карцином

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 повърхности невронални антигени (NMDAR,GABAR, AMPAR, LGI1) се установяват чрез имунофлоуресценция на специфичен субстрат (HEK293 клетки). При пациенти с MNDAR антитела, те могат да се срещнат в цереброспиналната течност, дори да липсват в серума, обратно на LGI1 антитела при не-паранеопластичен 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-AMPAR енцефалит
Anti LGI1 енцефалит
Anti- GABA bR енцефалит
Anti – Aqp4 енцефалит
Anti-MOG енцефалит
Anti-GAD енцефалит
Anti – GlyRα1 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 пренареждания

Лабораторията по клинична имунология трябва да е в състояние 1) да установи наличието, да определи количеството и да идентифицират типа на моноклонални протеини: ИгГ, ИгА, ИгМ, ИгД, ИгЕ, 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 плазмоцити 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), мултиплексен 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 установено наличие на 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 електрофореза, 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: IgGκ и IgGλ, IgAκ и IgAλ, IgMκ и IgMλ***, 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 (<10g/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 имуноглобулиниви 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 имуноглобулиниви 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. мононуклеарни клетки от периферна кръв или тонзилални 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 хемопоетични прекурсори с нарушена диференциация и съзряване, в резултат на което е нарушена нормалната функция на кръвните клетъчни елементи. Взависимост от нивото на малигнена трансформация и засегната хемопоетична линия левкемиите могат да имат фенотип на миелоидна, моноцитна, лимфоидна (В и Т-клетъчна), промиелоцитна еритроидна, мегакариобластна, прекурсорна плазмацитоидно-дендритноклетъчна диференциация или недиференциран или смесено-клетъчен 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 костно-мозъчна 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, колонио-стимулиращи 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 матурационен 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 с: 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 с CD19 и т.н.). Маркери на ранни стадии на матурация се комбинират с късни (например CD15 с 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, абнормална 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 наличие на 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 (B/T/NK-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, колонио-стимулиращи 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 количество 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/NK-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 допълнителна информация в диференциално диагностичния 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 лимфоцитоза, хронична лимфоцитна левкемия, трихолевкемия, синдром на Сезари) или дефиниране на нозологична категория/ линейна принадлежност и деференциалнодиагностични възможности (напр. зрялоклетъчен В-клетъчен лимфом по типа на мантелноклетъчен и т.н.)

3. Имунофенотипизация на плазмоклетъчни неоплазии

Плазмоклетъчните неоплазии настъпват в резултат на малигнена трансформация на плазмоцити, в резултат на което настъпва клонална експанзия в костния мозък и/или в екстрамедуларни локализации и се характеризира със завишена продукция на моноклонален парапротеин.

За флоуцитометрично имунофенотипизиране на плазмоклетъчни неоплазии е необходимо изследване на костен мозък. По изключение, при клинични индикации за плазмоклетъчна 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.

Имунофенотипизирането на плазмоклетъчни 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 плазмоклетъчно съдържание, без да се формулира диагностична оценка относно наличие или липса на неоплазия.

Диагностичните лаборатории, които осъществяват имунофенотипизация на плазмоклетъчни неоплазии трябва да използват консенсусно приетите панели, които съдържат:

- Гейтиращи маркери. Всички епруветки следва да съдържат CD138 (vs SSC) за идентифициране на плазмоцитната популация (препоръчително конюгиран с един и същ флуорохром). Добавянето на CD38, CD19 и CD45 във всички епруветки прецизира диференцирания анализ на имунофенотипа на нормалната и неопластична плазмоцитна 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 плазмоцити: CD20, CD56, CD117, CD27, CD28, CD81; б) дефиниране на клоналност чрез оценка на цитоплазмена екпресия на карра / lambda леки вериги.

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

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

Независимо от постигане на пълна ремисия, малигненият клон при злокачествени хематологични заболявания (левкемии, левкемизирали лимфоми, плазмоклетъчни 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, плазмоклетъчни 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. Имунофенотипизирането 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 $1:10^4$ до $1:10^5$.

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, cyCD3, 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 анализа; 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 хемопоетични стволови клетки. До скоро изследването за търсене на PNH клон се оцъщесвяваше 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 (пълен 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 антитела 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. Имуноцитохимично и имунохистохимично изследване на интрануклеарни/ цитоплазмени/ мебранни 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 микросредата, пролиферативна активност, имуноглобулини и леки вериги и др. може да се осъществи и чрез идентифициране и локализиране на интрануклеарни/цитоплазмени/ 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 има възможности за морфологично изследване или създава 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, цитоплазмено, ядрено, мембранно), а при необходимост и коментар на контролите и използваните антитела/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 използвания 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 антитела. Определянето на броя $CD34^+$

хемопоетични стволови клетки чрез флоуцитометрия не изисква включване на изотипна контрола. Всяка лаборатория може да използва допълнителни комбинации от моноклонални антитела за изследване на други маркери (определяне на субпопулации) за нуждите на дианостично-лечебния процес. За определяне на броя $CD34^+$ хемопоетични стволови клетки чрез флоуцитометрия се използват $CD34^+$ антитела 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 антитела, 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 $CD34^+$ хемопоетични 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 хемопоетични 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 $CD34^+$ хемопоетични 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 $CD34^+$ хемопоетични стволови клетки може да се определя: а) индиректно на базата на абсолютния брой левкоцити, определен чрез хематологичен анализатор, и определения флоуцитометрично процент $CD34^+$ хемопоетични 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 мултипления 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 λ=488nm, 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 дойноверижна 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 пермеабилизация на клетъчната мембрана. За ДНК анализ на витални клетки в практиката най-често се използва bis-benzimidazole, Hoechst 33342. При използване на източник на UV лъчи, се използва 4’6-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 10^6/ml. По отношение на най-честия ДНК маркер – PI, за маркиране на 10^6 клетки се препоръчва използването на не по-малко от 20μg.

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

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

Литература

1. Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L.,Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J. (Eds): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th edition). lARC: Lyon 2017. ISBN 978-92-832-4494-3
2. A. Porwit and M. C. Béné (eds), Multiparameter flow cytometry in the diagnosis of hematologic malignancies Cambridge University Press, Cambridge, 2018, ISBN 978-1-107-50383-0.
3. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al: International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. Lancet Oncol 15:e538-e548, 2014.
4. Valérie de Haas, Nofisat Ismaila, and Ling Zhang, 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

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

1. Лабораторията да е в състояние да определя ин витро алерген специфична активация/дегранулация на базофилни гранулоцити чрез флоуцитометрия.

2. Пациентите, тестирани ин витро, 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. Ин витро активацията се извършва в чисти помещения и закрити боксове.

28. или за всяка нова партида алергени.

5. Всяко определяне на активация/дегранулация на базофили включва отрицателна и положителна контрола. Като положителна контрола се използва неспецифичен активатор (например хемотаксичен пептид fMLP).

6. Данните се събират през аналитичен прозорец за базофилната популация, експресираща високи нива на ИгЕ.

7. Изброяват се най-малко 1000 базофила за проба или 50 000 до 100 000 левкоцита при анализ на клетките според параметъра големина (FSC).

8. Определя се процентът на дегранулираните базофилни гранулоцити според експресията на активационния антиген gp 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

A. 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 ЕДТА, 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^{o}C, но не повече от 5 дни преди изследването; за по-дълго време пробата се замразява съгласно инструкциите на производителя, напр. на -20^{o}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 – имуно-ензимни (ELISA, имуноблот), хемилуминисцентни, електрохемилуминесцентни (ECLIA), флуориметрични и др.

B. 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 анти-борелийни 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 (хемилуминисцентен имунен 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 персистират 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 имуно-ензимен, директен флуоресцентен тест или други утвърдени техники. Тук диагностично значение имат *anti-Chlamidia trahomatis* IgA и IgG, докато анти-хламидийните IgM в серума на новородено могат да бъдат индикация за пневмония при налични клинични данни. Показанията за изследване на анти-хламидийни антитела са: съмнение за урогенитална хламидиална инфекция, синдром на Райтер, тазова възпалителна болест. По-висока диагностична стойност от определянето на специфичните анти-хламидийни антитела имат PCR или клетъчната култура за доказване на самия причинител.

3. Атипични хламидийна пневмония

Определят се антитела срещу Хламидофила пневмоние (*anti-Chlamydophilla pneumoniae антитела) от клас* IgM, IgG, IgA при следните показания: данни за хламидиална 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 ли друга атипична пневмония; други екстра-пулмонарни 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 пост-стрептококови заболявания

Определя се антистрептолизов 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. <u>ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СПЕЦИФИЧНИ ВИРУСНИ АНТИГЕНИ И АНТИ-ВИРУСНИ АНТИТЕЛА. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВИРУСНИ НУКЛЕИНОВИ КИСЕЛИНИ</u>

1. Вирусни хепатити

Разпространени с различна честота по целия свят като епидемични или спорадични заболявания с голямо социално-медицинско 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 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 срешу енвелоп антиген (anti-HBe), енвелоп хепатит В-антиген (HBeAg). В изследването им се използват различни методи – ELISA, електрохемилуминесценция (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 разпознае 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 анти-HBcIgG и HBeAg. Появата на HBeAg е белег на активна вирусна репликация и висока инфекциозност в кръвта, а установяването на анти-HBe антитела в острата фаза е признак за благоприятно протичане. В „прозоречния“ период на острата инфекция не се откриват HBsAg и анти-HBs антитела поради образуване на имунни комплекси и диагнозата се осигурява от наличието на анти-HBc IgM. Допълващ метод е полимеразната верижна реакция (PCR) от кръв на болен, която измерва количеството на виремията (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 анти-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-я месец и е признак за излекуване, докато персистирането й – за хронифициране.

1.4. антитела в серума срещу вируса на хепатит D (anti-HDV) за скрининг за хепатит D вирусна инфекция - при остра анти-HDV IgM, а при хронична – анти-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 амплификация 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 имуноблот. 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 и след 6 месеца от заразяването, но към 14-20 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 имуносупресирани (HIV пациенти, след кортикостероидно или друго имуносупресивно 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 наличие на показания за остра, реактивирана или латентна

инфекциозна мононуклеоза, както и лимфопролиферативни заболявания, се определят специфични анти-вирусни 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 ИгМ 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 анти-вирусни антитела срещу вируса 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 преболедуване 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 имункомпрометирани херпес зостер може да прочете като генерализирана инфекция с фатален изход. Определят се специфични анти-вирусни 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-медиираният 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 анти-морбилни антитела - IgM и IgG. Показателно за свежа инфекция е установяване на специфичните ИгМ 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 висока контагиозна, протична епидемично и спорадично, а възприемчивостта е всеобща. Определят се специфични анти-вирусни 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 анти-вирусните IgG се приема, че се касае за трансплацентарно преминали майчини антитела и липса на инфекция у детето, докато установяването на специфични IgM и нарастване на анти-рубеолните 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 анти-паротитни 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 ИгМ 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. BK вирус

BK вирусът е изолиран през 1971 г от урината на реципиент с уретерна стеноза след бъбречна трансплантация, но едва 20 години по-късно BK е разпознат като причина за интерстициален нефрит и загуба на присадката при този контингент болни. BK вирусът е почти повсеместен при възрастни със серопозитивност над 90%. След първичната инфекция вирусът се установява в латентност в уроепиталите и бъбречните тубуларни епителни клетки. При наличие на имуносупресия се реактивира и реплицира, предизвиквайки каскада от събития, започващи с разрушаване на тубуларните клетки и вирурия. В последствие BK се размножава в интерстициума и преминава в перитубуларните капиляри, причинявайки виремия и евентуално навлиза в присадката, което води до различни тубулоинтерстициални лезии и нефропатия. При пациенти с трансплантация на хемопоетични стволови клетки, реактивацита може да предизвика хеморагичен цистит. Вирусната репликация се изследва в клиничен материал серум/плазма и/или урина при пациенти след бъбречна или стволово-клетъчна 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 асимптоматично. След това вирусът остава като персистираща латентна инфекция в бъбреците и се отделя в урината. В контекста на имуносупресивно състояние, като СПИН и трансплантации, JCV се разпространява в ЦНС и литично инфектира олигодендроцити, 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 мононуклеозно 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, костно-мозъчна 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, индуцирана от лекарства (DIHS) или лекарствена реакция с еозинофилия и системни симптоми (DRESS), синдром на Сьогрен, саркоидоза, системна лупус еритематозус, синдром на хроничната умора (CFS), синдром на Guillain-Barré, 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 ендогенна микоза. Втората по честота инвазивна микоза е инвазивната аспергилоза. Те атакуват имуносупресирани 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 анти-ехинококови антитела – IgG. Препоръчително е потвърждаването на специфичните антитела от клас IgG към *Echinococcus granulosus* с имуноблот.

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 заболяването, 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 токсо-алергичен 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 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 анти-токсакарни антитела IgG**.** Показания**:** неизяснени алергични заболявания, неповлиявящи 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 имуноблот.

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 анти-лайшманиозни антитела IgM и IgG при кожна, кожно-лигавична или висцерална лайшманиоза. В допълнение на имунодиагностиката е и PCR.

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

Пациентите за органна трансплантация, сенсибилизирани 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 сенсибилизирани пациенти е 20.45%. Обект на по-комплексна предтрансплантационна имунологична подготовка са "хиперсенсибилизираните" 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 акердитирани (EFI) структури по клинична имунология.**

Имуномодулиращо лечение на сенсибилизирани реципиенти за органна трансплантация се провежда с **гамаглобулин за интравенозна инфузия** и/или **терапевтична аферeза** 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-крос-мач реакция

- хиперсенсибилизираните 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 високомолекулярни 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 мг/кг/24ч- 3 апликации през ден
- **имуносупресори** –- по кратка характеристика (цилофосфамид, моноклонално антитяло)
- **моноклонално антитело** с насочено действие към В лимфоцити за подтискане на продуцираните от тях антитела
- **нормален човешки имуноглобулин за интравенозно приложение:**

* Извършва се съвместно със специалисти по нефрология

6. Алгоритъм за диагностика и лечение при безплодие и нарушения на бременността с автоимунен 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: анти-фосфолипидни антитела, лупусен антикоагулант, NK клетки, АНА, блокиращи антитела, анти-овариални антитела, анти-спермални антитела, спермална ДНК фрагментация, HLA крос мач
6. Имунохематологични- кръвногрупова принадлежност по АВО и Резус система, антиеритроцитни антитела, антилевкоцитни (анти-HLA антитела), антитромбоцитни антитела
7. Коагулационни - INR, aPTT

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

1. Acetysal - 80-100mg
2. Нискомолекулярен Heparin + Acetysal
3. Prednison (в ниски дози) + Acetysal
4. Интравенозни имуноглобулинови препарати (150-300mg/kg телесно тегло)
5. Intralipid 20% (5-10ml)
6. Лимфоцитна имунизация