

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

2016 г.

Регистрационный № 231-1215

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

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

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

Минск, 2016

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

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

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

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

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

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

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

D82.4. X-сцепленный лимфопролиферативный синдром.

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

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Нет.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АА – ацетат аммония

АЛПС – Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КМ – костный мозг

КТ – комнатная температура

МНК – моноклеарные клетки

ПИД – первичные иммунодефициты;

ПК – периферическая кровь

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТКИН – тяжелый комбинированный иммунодефицит

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЭДТА – этилен диамин тетроуксусная кислота

**ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ,
РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ
МЕДИЦИНСКИЕ ИЗДЕЛИЯ**

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

Центрифуга с охлаждением для пробирок объемом 15-50 мл.

ПЦР бокс.

Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Вортекс.

Водяная баня.

Генетический анализатор для проведения капиллярного электрофореза продуктов секвенирующей реакции.

Прибор, позволяющий измерять оптические свойства индивидуальных клеток в суспензии.

Документирующая система для визуализации результатов электрофореза.

Инкубатор для клеточных культур с 5% CO₂

Магнитная мешалка с подогревом.

Морозильник –20°С.

Спектрофотометр.

Термомиксер.

Холодильник.

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

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

мкл.

РЕАКТИВЫ

KCl.

MgCl₂.

NP40.

RPMI-1640.

SSC.
ДТТ.
Тақ ДНК полимераза.
Агароза.
Бромистый этидиум.
Вода деионизованная.
Набор праймеров
Моноклональные антитела для детекции субпопуляций лимфоцитов
Маркер молекулярного веса.
Набор для выделения РНК.
Набор для секвенирования, содержащий флуоресцентно-меченые дидезоксинуклеотиды.
Обратная транскриптаза.
Олигонуклеотиды.
Растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ).
Раствор DAPI.
Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1).
Формальдегид 3,7%/ФСБ.
Фосфатно-солевого буфер (ФСБ).
Хлороформ.
ЭДТА, 0,125М, рН 8,0.
ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка).
Этанол, 70%.
Этанол, 80%.
Этанол, 96%.

РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

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

Пробирки (объем - 0,2-50 мл).

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

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Схема метода включает в себя следующие этапы:

1. Проведение стандартного иммунологического исследования с определением относительного содержания Т-, В-лимфоцитов и естественных киллеров методом безотмывочной технологии.

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

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

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

4.1. подбор праймеров и условий амплификации;

4.2. выделение ДНК;

4.3. полимеразная цепная реакция (ПЦР) и однонитевой конформационный полиморфизм (SSCP);

4.4. секвенирование;

5. Диагностика синдромов с нарушением центральной толерантности:

5.1. Оменн синдром;

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

6. Диагностика синдромов с нарушением периферической толерантности:

6.1. Иммунодефицит, полиэндокринопатия, энтеропатия сыепленная с X-хромосомой;

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

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

1. Проведение стандартного иммунологического исследования с определением относительного содержания Т-, В-лимфоцитов и естественных киллеров методом безотмывочной технологии

Для проведения стандартного иммунологического исследования у пациентов берут периферическую кровь в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА (этилен-диамин тетрауксусная кислота). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводят методом семицветной проточной цитометрии с использованием процедуры безотмывочного лизирования с использованием моноклональных антител, конъюгированных с FITC, фикоэритрином (PE), ECD, PC-5, PC-7, APC, APC-Alexa 750. Иммунологические параметры для исследования состояния иммунной системы включают в себя следующие показатели клеточного иммунитета:

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

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

Для проведения стандартного иммунологического исследования у пациентов берут периферическую кровь в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА (этилен-диамин тетрауксусная кислота). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводят методом семицветной проточной цитометрии с использованием процедуры безотмывочного лизирования с использованием моноклональных антител, конъюгированных с FITC, фикоэритрином (PE), ECD, PC-5, PC-7, APC, APC-Alexa 750. Иммунологические параметры для исследования состояния иммунной системы включают в себя следующие дополнительные исследования: тимические мигранты (CD3+CD4+CD31+CD45RA+), наивные Т-хелперы (CD3+CD4+CD45RA+), Т-хелперы памяти (CD3+CD4+CD45RO+), наивные CD8+ Т-лимфоциты (CD3+CD8+CD45RA+), CD8+ памяти

(CD3+CD8+CD45RO+), регуляторные Т-лимфоциты (CD4+CD25+CD127-), дважды негативные Т-лимфоциты (CD3+CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ +).

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

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

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

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

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

4.1. подбор праймеров и условий амплификации;

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

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

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

4.2 Выделение ДНК из суспензии клеток

Клетки отмывают в фосфатно-солевом буфере или физиологическом растворе. После осаждения часть жидкости оставляем в пробирке (20-40 мкл), осадок клеток тщательно ресуспензируют. Лизирующий буфер добавляют в объеме 100мкл на 1 млн. Пипетировать. Лизировать при 50-60°C при перемешивании в течении 1- 24 часов. Экстракция фенол-хлороформной смесью (фен-хл-изоам.спирт 25:24:1 рН=7.5-8.5). Фенол-хлороформную смесь добавлять в лизат в равном объеме (400 мкл на 600 мкл лизата). Центрифугировать 1 мин. при 1-5 000 оборотов. Отобрать верхнюю фазу. Перед второй экстракцией подержать пробирку в термомиксере при +50°C в течение 10 минут. Затем к лизату добавляют 8М ацетат аммония (АА) в объеме, равном половине объема лизата. Смесью тщательно перемешивают на центрифуге. Центрифугируют при 14.000 оборотах 10-20 минут с охлаждением.

Осаждение и отмывка ДНК. Добавить равный объем изопропанола. После отбора супернатанта добавить 70% этанол, 300 мкл если осадка очень мало и 500-700 мкл - если осадок выраженный. Перемешать переворачиванием и центрифугировать при максимальных оборотах 5-10 мин. Затем жидкость отбирают, осадок высушить в ламинаре в виде открытой пробирки, растворяют в 30-200 мкл ТЕ буфера в зависимости от количества осадка.

4.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и однонитевой конформационный полиморфизм

ПЦР реакции проводились в стандартных условиях: 1x ПЦР буфер с KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM дНТФ, 0,5 мкМ каждого праймера, 1U Taq полимеразы. Тотальная клеточная ДНК пациента вносится в количестве 100 нг. Кол-во циклов амплификации составляло 35. Простая ПЦР, объем - 25 мкл, ПЦР проводят на твердотельном амплификаторе.

После добавления персульфата аммония и TEMED все тщательно перемешать и в течение 5 минут залить гель. Полимеризоваться оставить на 1-2 часа при комнатной температуре.

Приготовление образцов: Промываем лунки геля 0,5x TBE буфером с помощью дозатора и тонкого наконечника. Ставим гель в камеру с 0,5 x TBE на 1 час при 200 Вольтах (6-8 Ватт). В это время готовят образцы для внесения в гель: смешиваем в пропорции 2:1 формамид и ПЦР продукт.

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

4.4 Секвенирование

Продукт ПЦР реакции, предназначенный для секвенирования, очищается от неспецифических продуктов амплификации с использованием электрофореза в 6% полиакриламидном геле и элюировался из вырезанного фрагмента геля в ТЕ (Трис-ЭДТА) – буфер (рН=8,0) в ходе инкубации в термомиксере при 45⁰С в течение 1 часа.

Далее очищенный образец используют в качестве матрицы для реакции секвенирования. Для секвенирования в каждую реакцию терминации вносилось 4 мкл ТЕ-буфера, содержащего очищенный ПЦР продукт, 3,2 пмоль прямого или обратного праймера, использовавшихся для ПЦР амплификации, 9 мкл чистой воды, 4 мкл раствора терминаторов и 2 мкл буфера для секвенирования. Продукты реакции терминации очищались от невстроившихся терминаторов преципитацией этанол/ЭДТА. Капиллярный электрофорез и детекция полученных продуктов терминации осуществлялись на автоматическом капиллярном секвенаторе.

5. Диагностика синдромов с нарушением центральной толерантности:

5.1. Оменн синдром

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

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

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

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

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

Синдром характеризуется классической триадой: кожнослизистый кандидоз, гипопаратиреоидизм и недостаточность надпочечников.

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

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

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

6. Диагностика синдромов с нарушением периферической толерантности:

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

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

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

Направление на секвенирование гена *FoxP3*:

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

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

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

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

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

Направление на секвенирование гена *Fas*:

- 1) в общем анализе крови (лимфоцитоз);
- 2) иммунограмма, в периферической крови дважды-негативных Т-лимфоцитов (ДНТ) с фенотипом CD3+CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ + более 3-5%.

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

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

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

Доминантная активирующая мутация E1021K в гене *PI(3)KCD* приводит к развитию комбинированного иммунодефицита - синдрома активации фосфоинозитид 3-киназы δ (PI(3)K) 1 типа. Первые проявления синдрома стартуют в раннем детском возрасте с инфекций респираторного тракта или лимфопролиферативных изменений. Нарушение противоинфекционной резистентности у таких больных ведет к развитию серьезных осложнений. У всех пациентов формируются рецидивирующие инфекции ЛОР-органов и

легких: отиты и синуситы, тонзиллиты, повторные бронхиты и пневмонии, из них с формированием бронхоэктазов. Больные с APDS1 предрасположены к инфекциям, вызываемым вирусами герпес-группы. Эпштейн-Барр и/или цитомегаловирусная инфекция развивается примерно у 70-80% пациентов. Чаще наблюдается виремия, реже – генерализация процесса. Инфекции, вызванные *H.simplex* и *H.varicella zoster* также выявляются. Описаны также поражения кожи в виде множественных бородавок, контаминация контагиозным моллюском. Грибковые инфекции кожи и слизистых отмечаются у части пациентов.

APDS1 ассоциирован с тяжелой лимфопролиферацией и нодулярной лимфоидной гиперплазией. Часто лимфоаденопатия и гепатоспленомегалия становятся первыми признаками заболевания. Характерно увеличение всех групп лимфоузлов, в том числе, в лимфоглоточном кольце, что может привести к апноэ. Спленомегалия описана примерно у половины пациентов с APDS1, гепатомегалия. У четверти больных тяжелой лимфоаденопатии и гепатоспленомегалии не развивается. Нодулярная лимфоидная гиперплазия слизистых описана у трети пациентов. Чаще очаги локализуются в бронхах и альвеолах или желудочно-кишечном тракте. Лимфоидная инфильтрация в легких приводит к прогрессирующей дыхательной недостаточности. Поражения кишечника сопровождаются клиникой энтероколита, мальабсорбцией, потерей в весе у детей.

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

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

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

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

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

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

Перечень возможных осложнений в выполнении метода и пути их устранения

Возможные сложности в проведении генетической диагностики первичных иммунодефицитов с нарушением центральной и периферической толерантности и способы их устранения изложены в таблице 1.

Таблица 1 – Возможные сложности в проведении генетической диагностики первичных иммунодефицитов и способы их устранения

Проблемы	Способы разрешения
-----------------	---------------------------

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