

Пути оптимизации иммунологического тестирования в клинической практике

Гомельский государственный медицинский университет;
Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель

Аннотация. В статье рассматриваются проблемы, возникающие перед практическими врачами и исследователями при оценке иммунного статуса для выявления предполагаемого вторичного иммунодефицита, и предлагаются пути их решения. Подчеркивается важная роль преемственности в работе врачей лабораторной медицины и клинических специалистов для повышения эффективности иммунологического обследования.

Ключевые слова: оценка иммунного статуса, вторичный иммунодефицит.

В настоящее время не существует практически ни одного заболевания, при котором не проявились бы в той или иной степени дисфункции иммунной системы [2, 3, 4]. Одновременно отмечается неуклонный рост иммуносупрессивных состояний, формирующихся под влиянием неблагоприятных воздействий среды обитания (радиация, химическое загрязнение воды, почвы, воздуха; напряженный темп жизни, хронические стрессы). В связи с этим в современных условиях существенно расширяются показания к оценке иммунного статуса, усиливается интерес представителей клинических специальностей к иммунологическим лабораторным исследованиям. Резко возросло количество направлений на обследование иммунного статуса от врачей разного профиля. В то же время в последние годы в практику лабораторий клинической иммунологии внедряются современные методы иммунодиагностики, которые расширяют возможности иммунологического тестирования, но при этом значительно увеличивают стоимость исследований. Поэтому в настоящее время особенно остро встает вопрос о путях повышения клинической эффективности иммунологического обследования.

На наш взгляд, решение этого вопроса состоит из двух основных составляющих.

1. Усовершенствование как алгоритма обследования пациентов, так и выполнения иммунологического анализа на всех его этапах – преданалитическом, аналитическом и постаналитическом.

2. Повышение «иммунологической» грамотности врачей.

Планирование алгоритма обследования включает обоснованное назначение иммунограммы, выбор оптимального срока первичного обследования (в ремиссии или в обострении основного заболевания), мониторинг на этапах лечения, объем обследования.

Основное показание к назначению иммунограммы – наличие клинических признаков иммунологической недостаточности. Наиболее часто – это тяжелое течение острых воспалительных заболеваний с резистентностью к традиционной терапии, хронические рецидивирующие инфекции различной этиологии, частые простудные заболевания с последующим длительным субфебрилитетом, микозы различных органов, лимфаденопатия при отсутствии патологии со стороны других органов и систем, лейкопенические состояния [5, 8].

При первичных иммунодефицитах дефекты различ-

ных звеньев иммунной системы достаточно хорошо охарактеризованы, определены диагностические критерии, на основании чего сформированы рекомендации по лабораторному обследованию [3, 5]. На практике чаще приходится сталкиваться с синдромом вторичной иммунологической недостаточности, для которого общепринятые рекомендации по срокам, кратности, объему обследования отсутствуют. Как известно, к вторичным иммунодефицитам (ВИД) относят нарушения иммунной системы, которые развиваются в позднем постнатальном периоде или у взрослых и не являются результатом какого-либо генетического дефекта [8, 9]. Некоторые из этих состояний могут возникать в результате приобретенных дефектов компонентов иммунной системы, например ВИЧ-инфекция, лимфопролиферативные заболевания. Остальные (их большинство) развиваются на фоне различных соматических и других болезней, а также под воздействием неблагоприятных для организма факторов, которые в ряде случаев сложно установить (так называемые «спонтанные» ВИД). Именно при таких процессах оценка иммунного статуса представляет серьезные трудности.

Большинство клинических иммунологов рекомендуют проводить первичное обследование при подозрении на ВИД в период ремиссии основного заболевания. Такое обследование позволит выявить наличие нарушений в иммунной системе в период ее спокойного функционирования [4]. Необходимо понимать, что рассчитывать на показатели иммунограммы, соответствующие здоровым лицам, врач может только при проведении обследования в период ремиссии. При различных заболеваниях, когда имеется выраженное напряжение или истощение той или иной функциональной системы, развивается компенсаторная реакция соседних систем в качестве приспособительного ответа, направленного на сохранение гомеостаза. То есть изменения в иммунограмме при обострении заболевания сами по себе не являются проявлением иммунопатологии, но отражают активность работы иммунной системы. Поэтому, если больному обследуется при текущем заболевании, врач может оценить лишь адекватность изменений в иммунограмме клиническому состоянию пациента.

Нерешенным в настоящее время остается вопрос о том, какие же изменения в иммунограмме при остром процессе считать адекватными и каковы количественные критерии оценки адекватности. Понятно, что отсут-

ствие реакции со стороны иммунной системы на фоне тяжелого течения заболевания само по себе уже является неблагоприятным признаком и свидетельствует о нарушении иммунологической реактивности. Но в большинстве клинических ситуаций развивается достаточно выраженная реакция иммунной системы, которая даже может носить повреждающий характер. Ответа на поставленный вопрос пока нет. Работы в этом направлении основаны на сопоставлении отклонений показателей иммунного статуса с прогнозом острого процесса, что позволит в перспективе выработать так называемую «норму патологии», которая характеризует нормергическую реакцию организма на процесс [1].

Вопрос о необходимости динамического наблюдения должен решаться врачом применительно к конкретной клинической ситуации. В зависимости от результатов клинико-иммунологического обследования выделяют 3 группы пациентов [2, 8]:

- 1) лица, имеющие клинические признаки иммунологической недостаточности в сочетании с изменениями лабораторных параметров иммунитета;
- 2) лица, имеющие только клинические признаки нарушений иммунитета без изменения его параметров;
- 3) лица, не имеющие клинических признаков нарушений иммунитета, но с отклонениями показателей иммунной системы.

В первом случае иммунологический мониторинг безусловно показан, особенно на этапах иммунокоррекции, тогда как во втором – контроль эффективности терапии базируется чаще всего только на клинических проявлениях.

Методические указания по срокам этапных иммунограмм при проведении иммуномодулирующей терапии отсутствуют, в связи с чем приводим сроки, рекомендованные Лебедевым К.А. и соавт. [4]:

- * ближайший результат – через 10-14 дней после окончания курса иммунотерапии;
- * отдаленный результат – через 1,5-2 месяца;
- * контрольные иммунограммы – через год в течение 3 лет.

Планирование спектра обследования приобретает особую актуальность в связи с возросшими возможностями современных иммунологических технологий. В частности, оснащение иммунологических лабораторий проточными цитофлуориметрами позволило отказаться от методов розеткообразования для определения популяций и субпопуляций лимфоцитов, а также дало возможность оценивать практически все параметры иммунной системы: функциональную активность иммунокомпетентных клеток, цитокиновый баланс, пролиферативный ответ на Т- и В-митогены, апоптоз лимфоцитов и фагоцитов, процессинг и презентацию антигена и другие. Внедрение этих показателей в клиническую практику сдерживается прежде всего потребностями практической медицины, так как расширение спектра обследования должно происходить только за счет параметров, клиническая значимость которых установлена и подтверждена научными данными. Поэтому в настоящее время идет накопление научной информации об особенностях изменения параметров иммунограммы при различных клинических проявлениях ВИД. Пока в большинстве иммунологических лабораторий нашей республики проточ-

ная цитометрия используется для выявления пяти основных популяций и субпопуляций лимфоцитов: Т-клетки, Т-хелперы, Т-цитотоксические, В-клетки, NK-клетки. Дополнительно к этому в стандартную иммунограмму включается, как правило, определение концентрации иммуноглобулинов А, М, G в сыворотке крови (по Манчини или имунотурбидиметрическим методом), циркулирующих иммунных комплексов (методом преципитации полистиленгликолем) и функциональной активности нейтрофилов (фагоцитоз, НСТ-тест с микроскопическим учетом результатов).

Решить вопрос о том, за счет каких параметров в первую очередь расширить спектр иммунофенотипирования, можно путем проведения иммунологического мониторинга больных с различными клиническими проявлениями ВИД.

На базе иммунологической лаборатории Республиканского научно-практического центра радиационной медицины и экологии человека (РНПЦ РМ и ЭЧ, г. Гомель) организовано проведение такого мониторинга для пациентов отделения иммунопатологии и аллергологии, наблюдающихся с диагнозами: хронический рецидивирующий фурункулез, герпес, рецидивирующие заболевания верхних дыхательных путей. Анализ результатов иммунофенотипирования, полученных у больных хроническим рецидивирующим фурункулезом в стадии ремиссии, выявил разнонаправленные сдвиги субпопуляций лимфоцитов, однако они никак не были связаны с клиническим состоянием пациентов, то есть сохранялись при обострении заболевания и в процессе лечения фурункулеза (обследованы одни и те же пациенты в динамике процесса). Это позволило нам предположить, что оценка основных субпопуляций лимфоцитов при данной патологии не является клинически информативной. В литературе также имеются указания, что сдвиги уровня популяций иммунокомпетентных клеток у больных с активным воспалительным процессом, по сравнению с их значениями у здоровых лиц или у этих же людей до заболевания, под действием иммуномодуляторов могут восстанавливаться, но часто это не улучшает клиническую картину заболевания или даже утяжеляет течение процесса [4].

Все изложенное указывает на необходимость поиска других, более информативных фенотипических показателей лимфоцитов. Интенсивное изучение патогенеза различных заболеваний выявило важную роль активированных лимфоцитов, регуляторных Т-клеток, субпопуляций В- и NK-клеток [7, 10, 11]. Поэтому иммунологами рассматривается вопрос о расширении спектра иммунофенотипирования за счет малых субпопуляций лимфоцитов (NKT-клетки, $\gamma\delta$ T-клетки, T-reg) и активированных клеток (HLA-DR+, CD25+, CD69+ и др.). Однако в настоящее время, хотя и выявлено изменение экспрессии ряда маркеров при некоторых патологических состояниях, их связь с особенностями клинического течения различных заболеваний не установлена. Поэтому внедрение параметров малых субпопуляций в рутинную практику пока следует признать преждевременным.

Оптимизация непосредственного выполнения иммунограммы должна, на наш взгляд, начинаться с вопросов стандартизации преаналитического и аналитического этапов и установления значений нормы. В противном случае сопоставление данных, полученных в различных

(Продолжение на стр. 53)

иммунологических лабораториях, и корректная оценка иммунного статуса становятся невозможными. Вопросы стандартизации цитометрических исследований активно обсуждаются в литературе [10, 12, 14, 15]. В качестве критериев стандартизации аналитического этапа наиболее приемлемо использование следующего подхода: лимфоцитарные ворота – не менее 95%; сумма CD3+CD4+ (%) и CD3+CD8+ (%) приближается к значениям CD3+ ($\pm 10\%$); сумма CD3+(%), CD19+(%), CD16+/CD56+ (%) должна быть более 95% [12].

При проведении любого клинического исследования требуется сопоставление полученных результатов с нормальными значениями, которые определяются путем обследования контрольной группы. При этом в зависимости от методологии установления референсного интервала результаты такого сравнения могут быть различными. Референсные интервалы распределения основных субпопуляций лимфоцитов устанавливаются обычно при обследовании практически здоровых лиц, как в целом принято в клинической лабораторной диагностике. В то же время анализ литературы показывает значительные различия как в подходах к выбору контингента обследованных, так и в определении интервалов нормальных значений. Это является одной из причин существенных расхождений референсных интервалов, приведенных в различных исследованиях [6, 10]. При формировании контрольной группы по параметрам иммунного статуса критериями исключения являются отклонения в общем анализе крови, недавно перенесенные инфекции [12], а при более строгом подходе – значения индекса массы тела < 20 или > 33 кг/м², вегетарианство, нарушения функции печени и почек, терапия гормонами и иммуномодулирующими препаратами, злоупотребление алкоголем, острые или тяжелые хронические заболевания [13], то есть факторы, которые могут существенно повлиять на состояние иммунитета.

В нашей лаборатории при определении интервала нормальных значений использован, на наш взгляд, более удобный подход, который с успехом можно применить в других иммунологических лабораториях республики для выработки унифицированных критериев нормы. Контрольная группа формировалась из сотрудников РНПЦ РМ и ЭЧ, а также студентов Гомельского медицинского университета по следующей схеме. На первом этапе проводилось анкетирование с помощью специальных вопросников для выявления клинических признаков иммунологической недостаточности (табл. 1), затем проведен общий и биохимический (по основным параметрам) анализ крови. При отсутствии отклонений осуществлялось иммунофенотипирование с учетом требований преданалитического и аналитического этапов, изложенных выше.

Данная анкета учитывает особенности Гомельского региона, но может быть легко адаптирована для других областей Республики Беларусь.

Второй существенный вопрос: какой диапазон колебаний изученных параметров следует признать за норму? Сравнение интервалов распределения основных популяций и субпопуляций лимфоцитов в периферической крови взрослых здоровых лиц, полученных исследователями с применением различных критериев, представлено в табл. 2.

Как видно из табл. 2, диапазон нормальных значений по основным субпопуляциям лимфоцитов является достаточно широким, но в целом его значения в работах различных авторов совпадают. В случаях, когда лабораторные показатели подчинялись нормальному распределению, интервал нормальных значений принимался в пределах $\pm 2SD$ от средней арифметической. Однако мы рекомендуем при определении нормы по субпопуляционному составу лимфоцитов использовать только непараметрические методы, так как они применимы для любых распределений, а количество обследованных

Таблица 1. Анкета для выявления клинических признаков иммунологической недостаточности

Паспортная часть	
Ф.И.О.	Дата рождения
Место постоянного проживания	Контактный телефон
Являются ли ликвидаторами Ваши родители?	Проживаете ли Вы постоянно на территории с высоким уровнем радиации?
Отметьте наличие в данный момент или в анамнезе:	
Аллергические реакции	Аутоиммунное заболевание
Хронические воспалительные заболевания (какие?)	Паразитарные инфекции, инвазии
Грибковые заболевания кожи, слизистых, ногтей	Опухоли
Рецидивирующие гнойные конъюнктивиты	Афтозный стоматит, заболевания пародонта
Длительный субфебрилитет, лихорадка неясного происхождения	Рецидивирующая герпетическая инфекция (> 4 раз в год)
Алопеция	Рецидивирующие лимфадениты
Хронические рецидивирующие инфекции ЛОР-органов	Де- и гиперпигментации кожи
Хронические урогенитальные инфекции	Длительные, устойчивые к антибиотикам инфекции
Хронические рецидивирующие инфекции дыхательной системы	Распространенные бородавки, остроконечные кандиломы
Хламидиоз, микоплазмоз, уреаплазмоз	Дисбактериоз, диарея неясного происхождения
Рецидивирующие инфекции кожи и/или подкожной клетчатки	Тяжелые травмы, отравления
Сколько раз в год болеете ОРВИ?	Длительный прием кортикостероидов, антибиотиков в течение последнего года
Осложнения переливания крови	Имеются ли на данный момент жалобы, если да, то какие?
Проходили ли ранее иммунологические обследование (место, дата)	
Вы согласны, если данные Вашей иммунограммы будут использованы в научных целях?	

Таблица 2. Сравнение интервалов нормальных значений субпопуляционного состава лимфоцитов, приводимых различными авторами

n=40	Собственные данные	
	Центральное значение	Интервал нормы
CD3+	69,2	62,8–74,9*
CD3+4+	39,3	34,2–43,2*
CD3+8+	24,6	20,7–26,9*
CD19+	10,2	8,6–11,6*
NK	14,0	9,8–20,5*
n=965 A. Santagostino et al, Haematologica 1999 [12]		
	Центральное значение	Интервал нормы
CD3+	75	60–87***
CD3+4+	45	32–61**
CD3+8+	26	14–43**
CD19+	11	5–20**
NK	12	4–28**
n=232 Wee J, Chng et al, Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology, 2004; [16]		
	Центральное значение	Интервал нормы
CD3+	68,0	49,0–80,0**
CD3+4+	35,0	23,0–48,2***
CD3+8+	27,0	13,4–41,0***
CD19+	14,0	7,0–28,0**
NK	16,0	6,0–37,0**
n=208 Kai Man Kam et al, Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology, 1996; [14]		
	Центральное значение	Интервал нормы**
CD3+	69,2	54,8–83,0
CD3+4+	36,0	23,1–51,0
CD3+8+	29,1	17,9–47,5
CD19+	10,8	5,1–20,8
NK	19,1	7,1–38,0

* – интервал нижний квартиль (25%) – верхний квартиль (75%);
 ** – доверительный интервал 2,5–97,5%;
 *** – mean $\pm$ 2SD.

здоровых лиц в большинстве научных публикаций составляет не более 30–50 человек. Так, проведенный нами анализ характера распределения исследованных параметров (по Колмогорову-Смирнову) позволил установить, что во всех случаях распределение отличалось от нормального, на основании чего диапазон нормы мы представили в 2-х вариантах – интерквартильный размах (25–75%) и доверительный интервал (2,5–97,5%).

Мы провели сопоставление индивидуальных параметров субпопуляционного состава лимфоцитов пациентов, имеющих клинические признаки вторичной иммунологической недостаточности, со значениями контрольной группы (табл. 2). В обследование были включены 262 больных, проходивших лечение в отделении иммунопатологии РНПЦ РМ и ЗЧ по поводу различных заболеваний: хроническая рецидивирующая пиодермия, рецидивирующие заболевания верхних дыхательных путей, рецидивирующая герпетическая инфекция кожи (все заболевания в стадии ремиссии), очаговая алопеция. При этом, несмотря на наличие колебаний в значениях отдельных параметров, приблизительно у 50% обследованных ко-

личество основных субпопуляций лимфоцитов не выходило за пределы интервала нормы (если принять за норму межквартильный интервал 25–75%), а у 92% находилось в диапазоне доверительного интервала 2,5–97,5% нормальных значений.

По-видимому, это связано с тем, что большинство ВИД возникают не вследствие дефектов каких-то звеньев иммунитета, а в результате нарушения взаимосвязей между компонентами иммунной системы [4]. Колебания субпопуляционного состава лимфоцитов в этих случаях являются лишь отражением протекающих в организме адаптационных процессов и поэтому за границы нормальных значений не выходят. Вышесказанное является дополнительным подтверждением низкой информативности оценки основных субпопуляций лимфоцитов при ВИД и свидетельствует о необходимости обоснованного пересмотра перечня показателей иммунофенотипирования при различных заболеваниях.

В связи с различными этиопатогенетическими механизмами развития вторичной иммунологической недостаточности, наиболее целесообразна разработка дифференцированных комплексов иммунологического обследования в зависимости от характера патологии.

Аналогичная работа по установлению значений нормы должна быть проведена и по другим показателям, входящим в состав иммунограммы (определение циркулирующих иммунных комплексов, реакция фагоцитоза, тест восстановления нитросинего тетразолия и др.), однако она возможна лишь при условии унификации иммунологических методов исследования. Пока остается только рекомендовать каждой лаборатории установление собственного диапазона нормальных значений, используя строгий подход к отбору контрольной группы, и обязательное проведение контроля качества исследований.

Одним из наиболее сложных этапов иммунологического тестирования, сдерживающим эффективное применение оценки иммунного статуса в клинической практике, является интерпретация результатов. В оптимальном варианте она должна производиться клиническим иммунологом в тесном контакте с врачом лабораторной диагностики. В ряде регионов республики, в связи с отсутствием подготовленных специалистов и несовершенством организации службы клинической иммунологии, назначение и интерпретация результатов оценки иммунного статуса осуществляется специалистами различного профиля, прежде всего врачами-терапевтами, как правило, не имеющими достаточных знаний в области клинической иммунологии. Отсюда такие проблемы, как необоснованные назначения иммунограммы, отсутствие мониторинга на этапах лечения, широкое и зачастую необоснованное использование иммуностимулирующих препаратов.

Хочется надеяться, что предусмотренное в настоящее время в типовых учебных программах преподавание студентам клинической иммунологии как самостоятельной дисциплины позволит сформировать профессиональное мировоззрение и создать основу для грамотного практического использования достижений этой сложнейшей и интереснейшей науки.

В заключение следует еще раз подчеркнуть, что

оценка иммунного статуса является клинически полезной только при условии правильного использования иммунологического тестирования, четком определении показаний для исследования, спектра исследования, а главное, — умелой интерпретации полученных результатов.

Литература

1. Абакумов М.М., Булава Г.В., Боровкова Н.В., Хватов В.Б. // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. — 2007. — № 8. — С.24-28.
2. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2003. — 604 с.
3. Клиническая иммунология и аллергология. / Под ред. Г. Лопора, Т. Фишера, Д. Адельмана. — М., 2000. — 806 с.
4. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунная недостаточность (выявление и лечение). — М.: Медицинская книга, 2003. — 443 с.
5. Нагуа, М. Секреты аллергологии и иммунологии / Пер. с англ. / М. Нагуа, М.Э. Гершвин. — М.: Биомед, 2004. — 320 с.
6. Тотолян А.А., Балдуева И.А., Бубнова Л.Н. и др. // Клиническая лабораторная диагностика. — 2001. — № 8. — С.38-45.
7. Шестакова Е.В., Зурочка А.В., Квятковская С.В. и др. // Медицинская иммунология. — 2008. — Т.10, № 4-5. — С. 463-466.
8. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. // Иммунология. — 1999. — № 1. — С.14-17.
9. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. // Иммунология. — 2001. — № 4. — С.4-6.
10. Хайдуков С.В., Сибиряк С.В., Зурочка А.В. и др. // Аллергология и иммунология. — 2008. — Т.9, №2. — С.199-204.
11. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян Арег. А., Череш-

нев В.А. // Медицинская иммунология. — 2009. — Т.11, № 2-3. — С.227-238.

12. Alberto Santagostino et al. // Haematologica. — 1999. — № 84. — P.499-504.

13. Clare F. Hodgkinson et al. // J. of Gerontology. — 2006. — Vol. 61A, N 9. — P. 907-917.

14. Kai Man Kam et al. // Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology. — 1996. — N3. — P. 326-330.

15. Thomas A. Fleisher, Joao Bosco Oliveira // J. Allergy and Clinical Immunology. — 2004. — Vol.114, N2. — P. 227-233.

16. Wee J.Chng, Guat B. Tan, Ponnudurai Kuperan // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. — 2004. — Vol.11, N1. — P. 168-173.

Annotation

Novikova I.A., Hamaliaka A.V., Prokopovich A.S.

The ways of immunological testing optimization in clinical practice

Gomel State Medical University, Republican Research Center of Radiation Medicine and Human Ecology

In the paper the authors discuss the problems arising in the practicing physicians and researchers at evaluation of immune system parameters for revealing of supposed secondary immune deficiency and propose the ways of their solutions. The importance of continuity in the work of laboratory medicine doctors and clinical specialists for rising the efficiency of immunological examination is accentuated.

Key words: evaluation of immune system parameters; secondary immune deficiency.

Поступила 11.01.2010 г.