

Федеральное медико-биологическое агентство

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»
Федерального медико-биологического агентства
(ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России)**

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации
Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите населения от
повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию
медико-социальной помощи

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В-КЛЕТОК И ИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Методические рекомендации

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России МР.12 № 5 –2024

Москва,

2024

Предисловие

1. Настоящие методические рекомендации разработаны в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России)

Директор – член-корр. РАН, д-р. мед. наук, профессор Хаитов М.Р.

Заместитель директора по клинической работе, главный врач, д-р мед. наук, профессор Ильина Н.И.

2. Исполнители:

заведующий лабораторией клинической

иммунологии, д-р мед. наук

Пашенков М.В.

старший научный сотрудник лаборатории

клинической иммунологии, канд. биол. наук

Климова С.В.

3. В настоящем документе реализованы требования Федеральных законов Российской Федерации:

- от 21.11.2011 № 323-ФЗ (ред. от 01.04.2020) «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»;

- от 25.12.2018 № 489-ФЗ «О внесении изменений в статью 40 Федерального закона «Об обязательном медицинском страховании в Российской Федерации» и Федеральный закон «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» по вопросам клинических рекомендаций»;

- 21-й Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы медицинских исследований с участием человека в качестве объекта исследования» (прин. 06.1964 18-й Генеральной ассамблеей ВМА, с попр. 2020);

4. Введение в действие – с момента утверждения.

5. Введено впервые.

Содержание

Предисловие.....	2
Введение.....	4
1. Область применения.....	6
2. Нормативные ссылки.....	7
3. Термины и определения.....	9
4. Обозначения и сокращения.....	9
5. Методология.....	10
6. Показания к проведению исследования.....	11
7. Исследуемый материал.....	11
8. Оборудование.....	11
9. Расходные материалы.....	11
9.1. Лабораторный пластик.....	12
9.2. Моноклональные антитела к поверхностным маркерам лимфоцитов человека, меченные флуорохромами.....	12
9.3. Прочие реактивы.....	12
9.4. Подготовка реактивов.....	13
10. Процедура окрашивания образцов цельной крови моноклональными антителами.....	13
11. Анализ образцов на проточном цитофлуориметре.....	15
11.1. Общие положения.....	15
11.2. Запись проб.....	16
11.3. Определение Т-клеток и их субпопуляций, НК-клеток.....	16
11.4. Определение содержания В-клеток и их субпопуляций.....	17
12. Перечень определяемых параметров и референсные значения.....	18
13. Интерпретация результатов.....	19
Заключение.....	24
Библиография.....	25

Введение

Первичные иммунодефициты (ПИД) с преимущественной недостаточностью синтеза антител являются наиболее часто встречающейся в клинической практике разновидностью ПИД [1]. В основе этой группы ПИД лежит нарушение различных стадий дифференцировки В-клеток.

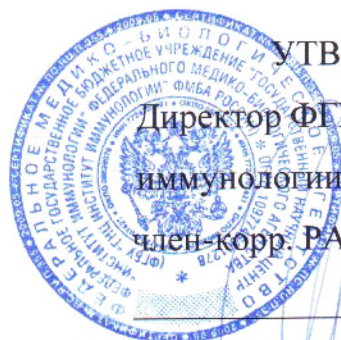
У пациентов с мутациями в гене *ВТК* дифференцировка В-клеток останавливается на стадии пре-В-клеток. Мутации в гене *ВТК* приводят к развитию X-сцепленной агаммаглобулинемии, для которой характерно резкое снижение уровней всех классов иммуноглобулинов в крови. Снижение процентного содержания CD19⁺ В-клеток до <2% от числа лимфоцитов, определяемое с помощью проточной цитометрии, является одним из диагностических критериев X-сцепленной агаммаглобулинемии.

Под термином «общая вариабельная иммунная недостаточность» (ОВИН) объединяют спектр ПИД, вызванных нарушениями более поздних этапов дифференцировки В-клеток. Конкретные генетические причины удается установить лишь примерно в 20% случаев ОВИН. Они включают в себя мутации в генах *CD19*, *CD20*, *TNFRSF13B*, *TNFRSF13C* и ряде других. Несмотря на гетерогенность клинических проявлений и генетических факторов, ПИД спектра ОВИН имеют общие лабораторные признаки, в частности: 1) выраженное снижение уровней IgG и IgA с/без снижения уровня IgM; 2) снижение численности переключенных В-клеток памяти, отражающее нарушение антиген-специфических этапов активации и дифференцировки В-клеток; 3) отсутствие признаков глубокого нарушения Т-клеточного звена. Снижение уровня переключенных CD19⁺CD27⁺IgD⁻ В-клеток памяти до <70% от возрастной нормы, выявляемое с помощью проточной цитометрии, является одним из обязательных диагностических критериев ОВИН, перечисленных в Федеральных клинических рекомендациях по первичным иммунодефицитам с преимущественной недостаточностью синтеза антител. Также проточная цитометрия позволяет выявить изменения численности других

субпопуляций В-клеток, наблюдаемые при некоторых вариантах ОВИН: увеличение содержания $CD19^+CD38^{hi}IgM^{hi}$ переходных (transitional) В-клеток, увеличение содержания $CD19^+CD21^{low/-}CD38^-$ В-клеток и т.д. [2].

Причинами вторичных гипогаммаглобулинемий являются снижение синтеза иммуноглобулинов, вызванное факторами внешней среды либо другими заболеваниями, а также увеличение потерь иммуноглобулинов [3]. При гипогаммаглобулинемиях, вызванных увеличенными потерями иммуноглобулинов, численность В-клеток и их субпопуляций не изменена. Определение субпопуляций В-клеток с помощью проточной цитометрии – единственный метод, позволяющий провести дифференциальный диагноз между гипогаммаглобулинемиями, вызванными нарушением синтеза и увеличенными потерями иммуноглобулинов.

Таким образом, определение численности В-клеток и их субпопуляций, выполняемое с помощью проточной цитометрии, играет важную роль в диагностике и дифференциальной диагностике агамма- и гипогаммаглобулинемий.



УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУ «ГНЦ Институт
иммунологии» ФМБА России

член-корр. РАН, д.м.н, профессор

М.Р. Хаитов

« 11 » декабря 2024 г.

Определение В-клеток и их субпопуляций с помощью проточной цитофлуориметрии

Методические рекомендации

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России МР.12 № 5 –2024

1. Область применения

Методические рекомендации распространяются на проблемы современной диагностики первичных иммунодефицитов.

В документе устанавливаются новые подходы к диагностике первичных иммунодефицитов В-клеточного звена иммунитета.

Методические рекомендации предназначены для практикующих врачей различных специальностей, в том числе для врачей аллергологов-иммунологов, врачей клинико-лабораторной диагностики, студентов и преподавателей медицинских вузов, аспирантов и ординаторов.

2. Нормативные ссылки

Настоящий документ разработан на основании рекомендаций и требований следующих нормативных правовых актов и нормативных документов:

- Порядок оказания медицинской помощи населению по профилю «аллергология и иммунология», утвержденный Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 7.11.2012 № 606н;

- Приказ Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 № 200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики» (рег. в Минюсте России 23.08.2016);

- Приказ Минздрава России от 13.10.2017 N 804н «Об утверждении номенклатуры медицинских услуг»;

- Приказ Минздрава России от 28.02.2019 № 103н «Об утверждении порядка и сроков разработки клинических рекомендаций, их пересмотра, типовой формы клинических рекомендаций и требований к их структуре, составу и научной обоснованности включаемой в клинические рекомендации информации»;

- Международная классификация болезней, травм и состояний, влияющих на здоровье (МКБ – 10);

- Первичные иммунодефициты с преимущественной недостаточностью синтеза антител (национальные клинические рекомендации), 2022.

https://raaci.ru/education/clinic_recomendations/632.html

- ГОСТ Р 52379-2005. Национальный стандарт РФ "Надлежащая клиническая практика" (утв. Приказом Ростехрегулирования от 27.09.2005 N 232-ст);

- ГОСТ Р 56606-2015. Национальный стандарт РФ "Контроль технического состояния и функционирования медицинских изделий. Основные положения" (утв. и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 5.10.2015 № 1451-ст);

- ГОСТ Р 57501-2017. Национальный стандарт РФ "Техническое обслуживание медицинских изделий. Требования для государственных закупок" (утв. и введен в

действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 08.06.2017 № 513-ст);

- Рекомендации Р ФМБА России 1- 2023 «Порядок разработки, изложения, представления на согласование и утверждение нормативных и методических документов, разрабатываемых научными организациями по заказу ФМБА России, в Комиссию Федерального медико-биологического агентства по рассмотрению нормативных и методических документов, разработанных при выполнении научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, осуществлении научно-технической и инновационной деятельности»;

- Лицензия от 06.03.2015 № ФС-99-01-009011 на осуществление медицинской деятельности (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России);

- Положение о Комитете по этике ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, созданном в 1996 г., последняя редакция Положения о Комитете по этике ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, утверждена протоколом № 12 от 18.08.2022;

- Одобрение локального этического комитета ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России (протокол № 5 от 18.03.2021).

Примечание – При пользовании настоящим документом целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю "Национальные стандарты", который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменён (изменён), то при пользовании настоящей методикой следует руководствоваться заменённым (изменённым) документом. Если ссылочный документ отменён без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3. Термины и определения

В настоящем документе применены следующие термины с соответствующими им определениями:

первичные иммунодефициты (ПИД): группа врожденных заболеваний иммунной системы, насчитывающая более 350 нозологий, связанных с утратой, уменьшением или неправильным функционированием одного или нескольких ее звеньев;

гипогаммаглобулинемия: снижение уровня IgG (иммуноглобулин G) в крови ниже 2-х стандартных отклонений от возрастной нормы у детей и ниже 450 мг/дл у взрослых;

агаммаглобулинемия: снижение уровня IgG в крови ниже 100 мг/дл (миллиграмм/децилитр) в сочетании с уровнем IgM (иммуноглобулин M) в крови ниже 20 мг/дл и уровнем IgA (иммуноглобулин A) в крови ниже 10 мг/дл при уровне периферических CD19+В-клеток ниже чем 2%;

ОВИН (общая вариабельная иммунная недостаточность): нарушение, характеризующееся гипогаммаглобулинемией, нарушением дифференцировки В-клеток и повышенной чувствительностью к инфекциям.

4. Обозначения и сокращения

ЗФР	– забуференный физиологический раствор
ОВИН	– общая вариабельная иммунная недостаточность
ПИД	– первичный иммунодефицит
BAFF	– B-cell activating factor (фактор активации В-клеток)
BAFF-R	– B-cell activating factor receptor (рецептор фактора активации В-клеток)
ВТК	– Bruton's tyrosine kinase (тирозинкиназа Брутона)
CD	– cluster of differentiation (кластер дифференцировки)

FITC	– флуоресцеина изотиоцианат
FSC	– Forward scatter (прямое, или малоугловое, светорассеяние)
NK-клетки	– естественные киллеры (Natural killers)
PE-Cy5	– тандемный флуорохром, состоящий из молекулы фикоэритрина и молекулы цианина-5
PerCP-Cy5.5	– тандемный флуорохром, состоящий из перидинин хлорофильного белкового комплекса и молекулы цианина-5.5
PE-Cy7	– тандемный флуорохром, состоящего из молекулы фикоэритрина и молекулы цианина-7
PE	– Phycoerythrin (фикоэритрин)
SSC	– Side scatter (боковое светорассеяние)

5. Методология

При разработке методических рекомендаций использовали наработки ведущих мировых и отечественных специалистов в области диагностики и лечения пациентов с врождёнными и приобретёнными иммунодефицитными состояниями [1–3].

Определение основных популяций и субпопуляций лимфоцитов при дифференциальной диагностике иммунной недостаточности:

- процентное содержание CD19⁺ В-клеток;
- процентное содержание субпопуляций В-клеток:
 - а) наивных;
 - б) краевой зоны;
 - в) переключенных клеток памяти;
 - г) переходных клеток;
 - д) плазмобластов;
 - е) анергических / ранее активированных.
- процентное содержание Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, двойных позитивных Т-клеток, CD56⁺ (CD16, 56⁺) Т-клеток, NK-клеток.

6. Показания для проведения исследования

Показаниями для проведения исследований может быть какое-либо из нижеперечисленных:

- диагностика общей вариабельной иммунной недостаточности;
- диагностика X-сцепленной агаммаглобулинемии;
- дифференциальная диагностика гипогаммаглобулинемий.

7. Исследуемый материал

Антикоагулированная венозная кровь (гепарин, КЗ-ЭДТА), не менее 1 мл.

Обязательно одновременное выполнение общего клинического анализа крови с лейкоцитарной формулой.

8. Оборудование

Для проведения исследований необходимо следующее оборудование:

- проточный цитофлуориметр, оборудованный каналами регистрации флуоресценции FITC, PE, PE-Cy5 (PerCP-Cy5.5) и соответствующим программным обеспечением (например, Cytomics FC500 [Beckman Coulter, США] или FACSCalibur [BD Immunocytometry Systems, США]);
- набор дозаторов объемом 1–10 мкл, 5–40 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл и 0,5–5 мл;
- вытяжной шкаф;
- охлаждаемая центрифуга с подвесными корзинами;
- холодильник лабораторный.

9. Расходные материалы

Для проведения исследований используются следующие расходные материалы.

9.1. Лабораторный пластик

Использовался следующий лабораторный пластик:

- одноразовые наконечники для дозаторов объемом до 10 мкл, 200 мкл, 1 мл и 5 мл;
- стерильные центрифужные пробирки объемом 15 мл;
- цитометрические пробирки из полистирола, размером 12*75 мм.

9.2. Моноклональные антитела к поверхностным маркерам лимфоцитов человека, меченные флуорохромами:

- изотипический контроль IgG1-FITC/IgG1-PE (Beckman Coulter, кат. номер A07794);
- анти-CD3-FITC/CD16+CD56-PE (Beckman Coulter, кат. номер A07735);
- анти-CD3-PerCP-Cy5.5 (eBioscience, кат.номер 45-0037-42);
- анти-CD4-FITC (eBioscience, кат.номер 11-0049-42);
- анти-CD8a-PE (eBioscience, кат.номер 12-0088-42);
- анти-CD19-FITC (eBioscience, кат.номер 11-0199-42);
- анти-CD21-PE (eBioscience, кат.номер 12-0219-42) ;
- анти-CD27-PE-Cy5 (eBioscience, кат.номер 15-0279-42);
- анти-CD38-PE-Cy5 (eBioscience, кат.номер 15-0389-42);
- анти-IgD-PE (eBioscience, кат.номер 12-9998-42);
- анти-IgM-PE (eBioscience, кат.номер 12-9868-42).
- анти-BAFF-R-PE (CD268-PE) (BD Biosciences, кат. номер 558097).

П р и м е ч а н и е – Возможна замена перечисленных антител на аналоги других производителей. Реагенты eBioscience не имеют российского регистрационного удостоверения. В РФ отсутствуют необходимые антитела к маркерам В-клеток, имеющие регистрационные удостоверения.

9.3. Прочие реактивы:

- Таблетки фосфатно-солевого буфера (Панэко, кат. номер P071). Хранят при комнатной температуре в течение срока годности, указанного на упаковке.
- Лизирующий раствор (концентрат) (BD FACS Lysing Solution, BD Biosciences, кат. номер 349202). Хранят при +4°C в течение срока годности, указанного на

флаконе.

- Параформальдегид (Sigma-Aldrich, кат. номер Р6148).

- Дистиллированная вода.

9.4 Подготовка реактивов:

- Забуференный физиологический раствор (ЗФР), рН 7,2-7,4. Растворяют 1 таблетку фосфатно-солевого буфера в 100 мл дистиллированной воды. Хранят при +4°C до 1 месяца.

- 2% раствор параформальдегида. Делают навеску 2 г параформальдегида. Добавляют 98 мл ЗФР. Инкубируют на водяной бане при +62°C, периодически помешивая, до полного растворения. Готовый раствор хранят при +4°C до 1 месяца.

- 1-кратный лизирующий раствор. Готовят непосредственно перед использованием. Для исследования одного образца крови необходимо 10 мл. Смешивают 1 мл концентрата лизирующего раствора и 9 мл дистиллированной воды. При исследовании большего количества образцов объемы пропорционально увеличивают.

10. Процедура окрашивания образцов цельной крови

МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

Процедура окрашивания образцов цельной крови моноклональными антителами проводится следующим образом:

- в одноразовую пробирку объемом 15 мл внести 2–3 мл антикоагулированной цельной крови (для доноров и пациентов с нормальным содержанием В-лимфоцитов – 2 мл, для пациентов со сниженным содержанием В-лимфоцитов – 3 мл). Добавить 10 мл ЗФР, тщательно перемешать, отцентрифугировать в течение 10 минут при 300g;

- отобрать надосадок, ресуспендировать осадок в 10 мл ЗФР, отцентрифугировать в течение 10 минут при 300g;

- повторить операции, описанные в предыдущем абзаце;

- осторожно отобрать надосадочную жидкость пипеткой, не задевая осадок.

Если объём осадка менее 1 мл – внести ЗФР до 1 мл, перемешать;

- приготовить цитометрические пробирки, по 9 штук на каждый исследуемый образец крови. Подписать двойной нумерацией: номер образца – номер пробирки;

- внести в каждую пробирку антитела чистыми одноразовыми наконечниками, не допуская контаминации антител во флаконах:

а) проба 1 – изотипический контроль IgG1-FITC/IgG1-PE в количестве 5 мкл на пробу;

б) проба 2 – Анти-CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PerCP-Cy5.5 в количестве 2,5/2,5/1,5 мкл на пробу соответственно;

в) проба 3 – Анти-CD3-FITC/CD16,56-PE в количестве 5 мкл на пробу;

г) проба 4 – Анти-CD19-FITC/IgD-PE/CD27-PE-Cy5 в количестве 2,5/1/1 мкл на пробу соответственно;

д) проба 5 – Анти-CD19-FITC/IgM-PE/CD27-PE-Cy5 в количестве 2,5/1/1 мкл на пробу соответственно;

е) проба 6 – Анти-CD19-FITC/IgD-PE/CD38-PE-Cy5 в количестве 2,5/1/0,75 мкл на пробу соответственно;

ж) проба 7 – Анти-CD19-FITC/IgM-PE/CD38-PE-Cy5 в количестве 2,5/1/0,75 мкл на пробу соответственно;

и) проба 8 – Анти-CD19-FITC/CD21-PE/CD38-PE-Cy5 в количестве 2,5/2/0,75 мкл на пробу соответственно;

к) проба 9 – Анти-CD19-FITC/BAFF-R-PE в количестве 2,5/1 мкл на пробу соответственно.

1. Примечание – Антитела к BAFF-R предварительно разводятся на ЗФР 1:5, вносят 1 мкл разведенных антител.

2. Примечание – Указанные объемы реагентов применимы к антителам, перечисленным в п. 9.2., и определены путем титрования в предварительных постановках. При переходе на другую партию антител или антитела другого производителя экспериментатор должен самостоятельно определить их необходимое количество на пробу путем титрования, чтобы получить сигнал приемлемой интенсивности.

- В каждую пробирку внести по 100 мкл отмытой цельной крови, аккуратно перемешать, не допуская образования пены. Инкубировать пробы 20 мин при комнатной температуре в темноте;

- Внести в каждую пробирку 1 мл лизирующего раствора, аккуратно перемешать, инкубировать 5–10 минут при комнатной температуре до достижения прозрачности раствора («лаковая кровь»), что свидетельствует о лизисе эритроцитов;
- Осадить лейкоциты центрифугированием при 300g в течение 5 минут. Слить надосажок резким однократным движением;
- Внести в каждую пробирку 2 мл ЗФР, перемешать на вортексе, осадить лейкоциты центрифугированием при 300g в течение 5 минут. Слить надосажок резким однократным движением;
- Внести в каждую пробирку 300 мкл ЗФР. Встряхнуть пробирки на вортексе.
- Анализировать пробы на проточном цитометре в течение 1 часа с момента завершения окраски. До анализа хранить пробы при температуре +4°C;
- Если немедленный анализ невозможен, то внести в пробирки по 300 мкл 2% раствора параформальдегида (конечная концентрация – 1%), перемешать и анализировать в течение 24 ч. До анализа хранить пробы при температуре +4°C.

11. Анализ образцов на проточном цитофлуориметре

11.1. Общие положения

- Настройку усиления и компенсации флуоресцентных сигналов проводят заранее по общепринятой процедуре. Для настройки усиления используют неокрашенные образцы крови, стремясь к тому, чтобы лимфоциты имели интенсивность свечения в пределах 1-й декады во всех каналах детекции флуоресценции. Для настройки компенсации используют образцы крови, окрашенные каждым антителом по отдельности, добиваясь того, чтобы свечение FITC-меченных антител регистрировалось только в канале флуоресценции FL-1, PE-меченных антител – в канале FL-2, PE-Cy5- и PerCP-Cy5.5-меченных антител – в канале FL-3 (FL-4 на цитометре Cytomics FC500). При переходе на новые партии антител следует проверить и при необходимости отрегулировать настройки прибора.
- Запуск, выключение, ежедневные и ежегодные процедуры технического обслуживания проточного цитофлуориметра проводятся в установленном порядке.

11.2. Запись проб

Запись проб производят следующим образом:

- создают дот-плот по параметрам малоуглового и бокового светорассеяния (FSC – SSC);
- Выделяют на цитограмме популяцию лимфоцитов по характерным показателям малоуглового и бокового светорассеяния (регион R1, гейт G1=R1);
- Для дальнейшего анализа В-клеток создают дот-плот на гейте G1 в координатах FL1 – SSC. С помощью региона R2 выделяют популяцию клеток, у которых свечение по первому каналу флуоресценции (FL1, антитела FITC-CD19) отличается от фонового. Создают гейт G2 = R1*R2;
- В пробах 1–3 набирают 20000 событий в G1;
- В пробах 4 – 9 набирают 5000 событий в G2.

11.3. Определение содержания Т-клеток и их субпопуляций, НК-клеток

Содержание Т-клеток и их субпопуляций, НК-клеток проводят следующим образом:

- популяцию лимфоцитов идентифицируют, как описано в разделе 11.2 (лимфоцитарный гейт G1);
- пробу 1 используют для выставления квадрантного маркера в остальных пробах, полученных из данного образца крови;
- определение Т-клеток проводят в пробе 2:
 - а) все Т-клетки идентифицируют как события в гейте G1 с фенотипом CD3⁺;
 - б) CD4⁺ Т-клетки идентифицируют как события в гейте G1 с фенотипом CD3⁺CD4⁺;
 - в) CD8⁺ Т-клетки идентифицируют как события в гейте G1 с фенотипом CD3⁺CD8⁺;
 - г) двойные позитивные Т-клетки идентифицируют как события в гейте G1 с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD8⁺.
- результаты в пробе 2 выдают в виде процентного содержания целевых популяций по отношению к общему числу лимфоцитов (G1);

- индекс $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ вычисляют как отношение процентного содержания $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток;
- НК-клетки определяют в пробе 3 как события в G1, позитивные по $CD16+CD56$ (FL2) и негативные по CD3 (FL1);
- $CD16, 56^+$ Т-клетки определяют в пробе С как события в G1, позитивные по $CD16+CD56$ (FL2) и позитивные по CD3 (FL1);
- результаты в пробе 3 выдают в виде процентного содержания целевых популяций по отношению к общему числу лимфоцитов (G1);
- абсолютное содержание субпопуляций лимфоцитов на 1 мкл крови вычисляют путем умножения процентного содержания соответствующей субпопуляции на число лимфоцитов в 1 мкл крови, определенное с помощью общего клинического анализа крови.

11.4. Определение содержания В-клеток и их субпопуляций

- Для определения В-клеток и их субпопуляций используют пробы 4–9;
- популяцию $CD19^+$ В-клеток выделяют как описано в разделе 11.2. События в G2 ($CD19^+$ В-клетки) выводят на отдельные дот-плоты (для каждого файла) в координатах FL2 – FL3;
- определяют процентное содержание $CD19^+$ В-клеток среди всех лимфоцитов в пробах 4–9. Вычисляют среднее значение, которое выдают в качестве результата;
- абсолютное содержание В-клеток на 1 мкл крови вычисляют путем умножения процентного содержания В-клеток на число лимфоцитов в 1 мкл крови, определенное с помощью общего клинического анализа крови;
- наивные В-клетки идентифицируют в пробе 4 как события в гейте G2 с фенотипом $IgD+CD27^-$. Определяют процентное содержание наивных В-клеток по отношению ко всем В-клеткам. Для подтверждения результата используют пробу 5, где наивные В-клетки идентифицируют как события в гейте G2 с фенотипом $IgM+CD27^-$;
- В-клетки краевой зоны идентифицируют в пробе 4 как события в гейте G2 с фенотипом $IgD+CD27^+$. Определяют процентное содержание В-клеток краевой зоны

по отношению ко всем В-клеткам. Для подтверждения результата используют пробу 5, где В-клетки краевой зоны идентифицируют как события в гейте G2 с фенотипом IgM+CD27+;

- переключенные В-клетки памяти идентифицируют в пробе 4 как события в гейте G2 с фенотипом IgD–CD27+. Определяют процентное содержание В-клеток памяти по отношению ко всем В-клеткам. Для подтверждения результата используют пробу 5, где переключенные В-клетки памяти идентифицируют как события в гейте G2 с фенотипом IgM–CD27+;

- переходные В-клетки идентифицируют в пробах 6 и 7 как события в гейте G2 с фенотипом IgDhiCD38hi и IgMhiCD38hi соответственно. Как правило, эти события образуют отдельную популяцию в координатах IgM – CD38, отделённую от остальных событий зоной разрежения. Определяют процентное содержание переходных В-клеток по отношению ко всем В-клеткам;

- плазмобласты идентифицируют в пробе 7 как события в гейте G2 с фенотипом IgM–CD38++. Определяют процентное содержание плазмобластов по отношению ко всем В-клеткам. Для подтверждения результата используют пробу 6, в этом случае плазмобласты идентифицируют как события в гейте G2 с фенотипом IgD–CD38++;

- анергичные / ранее активированные В-клетки идентифицируют в пробе 8 как события в гейте G2, негативные или слабопозитивные по CD21 и негативные по CD38 (CD21low/–CD38–). При этом следует учитывать, что основная популяция В-клеток имеет фенотип CD21hiCD38+. Определяют процентное содержание CD21low/–CD38– В-клеток по отношению ко всем В-клеткам;

- В-клетки, экспрессирующие BAFF-R (CD268), идентифицируют в пробе 9. Определяют процентное содержание BAFF-R+ клеток среди всех В-клеток.

12.Перечень определяемых параметров и референсные значения

При оценке процентного и абсолютного содержания Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, двойных позитивных Т-клеток, CD56⁺ (CD16, 56⁺) Т-клеток, НК-

клеток, В-клеток используют референс-интервалы, принятые в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (таблица 1, пункты с 1 по 15).

Референс-интервалы содержания субпопуляций В-клеток были определены нами путем исследования 96 доноров обоего пола в возрасте от 20 до 70 лет (таблица 1, пункты с 16 по 27). За нижнюю и верхнюю границы референс-интервалов приняты значения, соответственно, 2,5-го и 97,5-го перцентилей группы доноров (95% выборки).

Для сравнения в таблице 1 приведены референс-интервалы субпопуляций В-клеток из работы К. Warnatz и М. Schleiser [2]. Границами референс-интервалов в данном случае являются 5-й и 95-й перцентили выборки из 54 доноров в возрасте 19–61 лет (90% выборки). Референс-интервалы Warnatz & Schleiser [2] и ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России в целом сопоставимы; они несколько шире в группе ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, т.к. охватывают больший процент выборки доноров.

13. Интерпретация результатов

Результаты проб 2 и 3 позволяют определить содержание основных субпопуляций лимфоцитов крови.

Процентное содержание В-клеток среди лимфоцитов определяют в пробах 4–9. При нормальной общей численности В-клеток и корректном выполнении анализа коэффициент вариации процентного содержания В-клеток в пробах 4–9 не превышает 10%. При значительном разбросе процентного содержания В-клеток в разных пробах (коэффициент вариации >10%) следует убедиться в правильности выполнения окрашивания, при необходимости повторить анализ. При очень малой численности В-клеток (<1% от числа лимфоцитов) не всегда удается набрать 5000 событий в гейте G2. В этом случае коэффициент вариации процентного содержания В-клеток может превышать 10%, а данные по содержанию субпопуляций В-клеток могут быть недостоверны, что необходимо отмечать в комментариях к анализу.

Таблица 1 – Перечень определяемых параметров и их референсные интервалы

	Показатель	Проба	Норма*	Норма по [2]**
1	Лимфоциты (на 1 мкл крови)***	–	1200 – 3000	—
2	CD3 ⁺ Т-клетки (% лимфоцитов)	2–3	55 – 80	—
3	CD3 ⁺ Т-клетки (на 1 мкл крови)	2–3	800 – 2200	—
4	CD3 ⁺ CD4 ⁺ Т-хелперы (% лимфоцитов)	2	31 – 49	—
5	CD3 ⁺ CD4 ⁺ Т-хелперы (на 1 мкл крови)	2	600 – 1600	—
6	CD3 ⁺ CD8 ⁺ Т-цитотоксические (% лимфоцитов)	2	12 – 30	—
7	CD3 ⁺ CD8 ⁺ Т-цитотоксические (на 1 мкл крови)	2	190 – 650	—
8	Соотношение CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺	2	1,5 – 3,0	—
9	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ (% лимфоцитов)	2	< 2	—
10	CD3 ⁻ CD16,56 ⁺ NK-клетки (% лимфоцитов)	3	6 – 20	—
11	CD3 ⁻ CD16,56 ⁺ NK-клетки (на 1 мкл крови)	3	150 – 600	—
12	CD3 ⁺ CD16,56 ⁺ клетки (% лимфоцитов)	3	2 – 20	—
13	CD3 ⁺ CD16,56 ⁺ клетки (на 1 мкл крови)	3	28 – 460	—
14	CD19 ⁺ В-клетки (% лимфоцитов)	4–9	5 – 19	5 – 8,4
15	CD19 ⁺ В-клетки (на 1 мкл крови)	4–9	100 – 500	—
16	IgD ⁺ CD27 ⁻ наивные В-клетки (% В-клеток)	4	32 – 80	43 – 82
17	IgM ⁺ CD27 ⁻ наивные В-клетки (% В-клеток)	5	33 – 81	43 – 82
18	IgD ⁺ CD27 ⁺ В-клетки краевой зоны (% В-клеток)	4	7,5 – 37	7,5 – 32,5
19	IgM ⁺ CD27 ⁺ В-клетки краевой зоны (% В-клеток)	5	6,3 – 37	7,5 – 32,5
20	IgD ⁻ CD27 ⁺ переключенные В-клетки памяти (% В-клеток)	4	8,3 – 39	6,5 – 29
21	IgM ⁻ CD27 ⁺ переключенные В-клетки памяти (% В-клеток)	5	8,6 – 35	6,5 – 29
22	IgD ⁺ CD38 ⁺⁺ переходные В-клетки (% В-клеток)	6	0,9 – 7,2	0,6 – 3,4
23	IgM ⁺ CD38 ⁺⁺ переходные В-клетки (% В-клеток)	7	0,7 – 7,2	0,6 – 3,4
24	IgD ⁻ CD38 ⁺⁺⁺ плазмобласты (% В-клеток)	6	0,4 – 4,3	0,4 – 3,6
25	IgM ⁻ CD38 ⁺⁺⁺ плазмобласты (% В-клеток)	7	0,4 – 5,6	0,4 – 3,6
26	CD21 ^{low/-} CD38 ⁻ активированные В-клетки (% В-клеток)	8	1,3 – 10,0	0,9 – 7,6
27	BAFF-R ⁺ клетки (% В-клеток)	9	> 96 %	—

* Референсные значения по данным ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА. Референсные интервалы содержания субпопуляций В-клеток (пункты с 16 по 27) определены нами путем

исследования 96 доноров обоего пола в возрасте от 20 до 70 лет (2,5-й - 97,5-й перцентили группы доноров).

** Референс-интервалы в работе K.Warnatz и M.Schleiser [2] были определены путем исследования 54 доноров в возрасте 19-61 лет (5-й - 95-й перцентили).

*** Определяется при общем клиническом анализе крови.

Определение наивных В-клеток, В-клеток краевой зоны и переключенных В-клеток памяти проводят в пробах 4 (по окрашиванию CD19/CD27/IgD) и 5 (по окрашиванию CD19/CD27/IgM). Оба способа должны давать сопоставимые результаты. При исследовании здоровых доноров различия результатов в пробах 4 и 5 не должны превышать: для наивных В-клеток – 20% от их содержания в пробе 4, для В-клеток краевой зоны и переключенных В-клеток памяти – 40% от их содержания в пробе 4. При более значительных различиях необходимо проверить качество реактивов и правильность выполнения окрашивания. Недостаточная отмывка форменных элементов крови от плазмы, содержащей большое количество IgM, может приводить к снижению интенсивности окрашивания клеток антителами к IgM и к занижению численности IgM⁺ субпопуляций. При оценке численности наивных В-клеток, В-клеток краевой зоны и переключенных В-клеток памяти следует ориентироваться на результаты в пробе 4; результаты в пробе 5 имеют подтверждающее значение.

Определение переходных (transitional, «пре-наивных») В-клеток проводят в пробах 6 и 7. Поскольку данная субпопуляция В-клеток является гетерогенной и включает клетки с фенотипами как IgM^{hi}IgD^{low}, так и IgM^{low}IgD^{hi} [4], то результаты в пробах 6 и 7 могут существенно различаться. Первостепенное значение имеют изменения содержания переходных В-клеток с фенотипом CD19⁺CD38^{hi}IgM^{hi} (проба 7) [2].

Определение плазмобластов также проводят в пробах 6 и 7. Поскольку данная субпопуляция является наиболее малочисленной, результаты в пробе 7 могут отличаться от результатов в пробе 6 на 50% и более.

CD21^{low/-}CD38⁻ В-клетки определяют в пробе 8. В литературе нет единого мнения о природе этих клеток: в разных работах их интерпретируют как ранее активированные В-клетки, анергичные В-клетки, аутореактивные В-клетки [5–7].

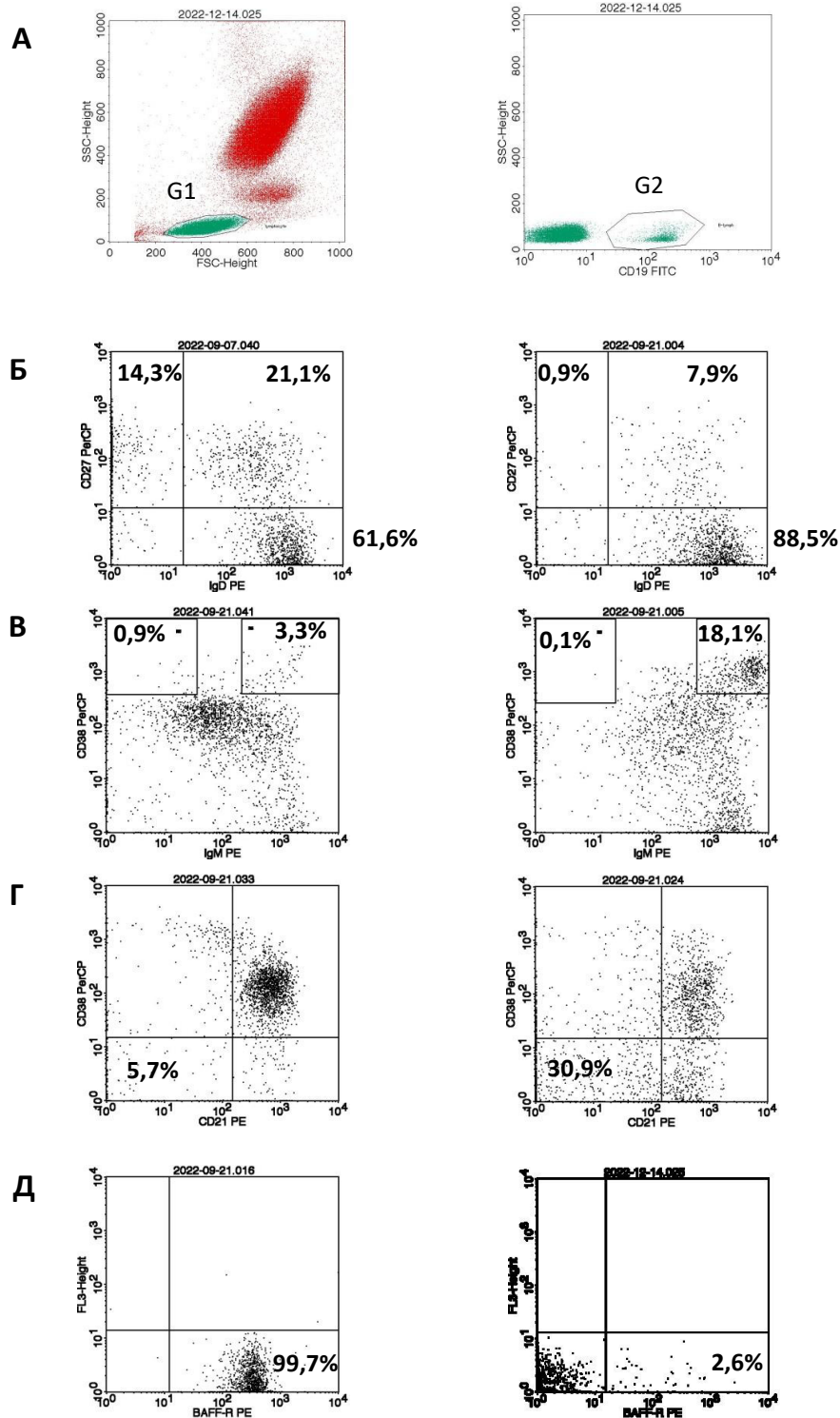
Увеличение содержания этих клеток наблюдается при аутоиммунных заболеваниях, а также у некоторых пациентов с ОВИН [2].

Рецептор к активационному фактору В-клеток BAFF (BAFF-R, проба 9), как правило, экспрессируется на подавляющем большинстве В-клеток (>96%), однако уровень экспрессии может варьировать. Необходимо учитывать, что эндогенный BAFF, присутствующий в плазме, связывается с BAFF-R и может либо конкурировать с антителами к BAFF-R, либо вызывать интернализацию рецептора, что будет приводить к снижению интенсивности окрашивания. В свою очередь, существует обратная корреляция между общей численностью В-клеток и уровнем сывороточного BAFF [8, 9]. Таким образом, снижение интенсивности окрашивания В-клеток антителами к BAFF-R при нормальном процентном содержании BAFF-R⁺ В-клеток, нередко наблюдаемое при ОВИН, отражает гиперпродукцию BAFF как компенсаторную реакцию на общее снижение численности В-клеток и/или нарушение их активации. Диагностическое значение имеет, по-видимому, лишь практически полное отсутствие BAFF-R⁺ В-клеток (<5%), что может указывать на генетически обусловленный дефицит BAFF-R.

Окончательную интерпретацию результатов, полученных с помощью данного метода, выполняет лечащий врач с учетом результатов клинического, инструментального и лабораторного исследований. Снижение содержания В-клеток до значений <2% от числа лимфоцитов характерно для X-сцепленной агаммаглобулинемии, однако может наблюдаться и у некоторых пациентов с ОВИН [2]. Для ОВИН характерно избирательное снижение процентного содержания переключенных В-клеток памяти (<70% от нормы).

Подтверждающими признаками ОВИН, которые наблюдаются не у всех пациентов, являются увеличение содержания переходных В-клеток и CD21^{low/-}CD38⁻ В-клеток и снижение процентного содержания BAFF-R⁺ В-клеток [2]. При наличии гипогаммаглобулинемии в сочетании с нормальным содержанием В-клеток и отсутствием изменений их субпопуляционного состава следует рассмотреть вторичный характер гипогаммаглобулинемии [3].

На рисунке 1 приведена типичная цитометрическая картина субпопуляций В-клеток, наблюдаемая у здоровых лиц и у пациентов с ОВИН.



А – пример выставления гейтов G1 (лимфоциты) и G2 (CD19⁺ В-клетки). Б – Д – различные субпопуляции В-клеток (G2) у здорового донора (левые графики) и пациентов с ОВИН (правые графики). Б – окрашивание антителами к CD27 и IgD. Наивные В-клетки – в нижнем правом квадранте, В-клетки краевой зоны – в верхнем правом квадранте, переключенные В-клетки памяти – в верхнем левом квадранте. В – окрашивание антителами к CD38 и IgM. Плазмобласты – в верхнем левом регионе, переходные В-клетки – в верхнем правом регионе. Г – окрашивание антителами к CD21 и CD38. CD21^{low}-CD38⁻ В-клетки – в

нижнем левом квадранте. Д – окрашивание антителами к VAFF-R. Числа на графиках – процентное содержание клеток в соответствующих квадрантах или регионах (от всех В-клеток).

Рисунок 1 – Типичные результаты цитометрического анализа В-клеток

Заключение

Таким образом, определение субпопуляций В-клеток с помощью проточной цитометрии играет важнейшую роль в диагностике первичных иммунодефицитов и дифференциальной диагностике гипогаммаглобулинемий. В ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России налажена и валидирована методика определения субпопуляций В-клеток с помощью реагентов, не имеющих российского регистрационного удостоверения. Референсные значения субпопуляций В-клеток, определенные с помощью данной методики, соответствуют мировым стандартам.

Библиография

- [1] Мухина А.А., Кузьменко Н.Б., Родина Ю.А., Кондратенко И.В., Бологов А.А., Латышева Т.В. и др. Характеристика пациентов с первичными иммунодефицитными состояниями в Российской Федерации: от рождения до старости. Педиатрия. – 2019. – т.98 (3) – с. 24-31.
- [2] Warnatz K., Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry B. Clin. Cytom.* – 2008 – v.74 (5) – p. 261-271.
- [3] Otani I.M., Lehman H.K., Jongco A.M., Tsao L.R., Azar A.E., Tarrant T.K. et al. Practical guidance for the diagnosis and management of secondary hypogammaglobulinemia: A Work Group Report of the AAAAI Primary Immunodeficiency and Altered Immune Response Committees. *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2022. – v.149 (5). – p. 1525-1560.
- [4] Cuss A.K., Avery D.T., Cannons J.L., Yu L.J., Nichols K.E., Shaw P.J. et al. Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity. *J. Immunol.* – 2006. – v.176 (3). – p. 1506-1516.
- [5] Thorarinsdottir K., Camponeschi A., Gjertsson I., Mårtensson I.L. CD21^{-/low} B cells: A Snapshot of a Unique B Cell Subset in Health and Disease. *Scand. J. Immunol.* – 2015. – v.82 (3). – p. 254-61.
- [6] Rakhmanov M., Keller B., Gutenberger S., Foerster C., Hoenig M., Driessen G. et al. Circulating CD21^{low} B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2009. – v.106 (32). – p. 13451-13456.
- [7] Reincke M.E., Payne K.J., Harder I., Strohmeier V., Voll R.E., Warnatz K. et al. The Antigen Presenting Potential of CD21^{low} B Cells. *Front. Immunol.* – 2020.
- [8] Barbosa R.R., Silva S.L., Silva S.P., Melo A.C., Pereira-Santos M.C., Barata J.T. et al. Reduced BAFF-R and increased TACI expression in common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* – 2014. – v.34(5). – p. 573-583.

[9] Kreuzaler M., Rauch M., Salzer U., Birmelin J., Rizzi M., Grimbacher B. et al. Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. *J. Immunol.* – 2012. – v.188(1). – p. 497-503.

Библиографические данные

УДК 616:612.017.1

МКС 11.100

Ключевые слова: ОВИН, первичные иммунодефициты, субпопуляции лимфоцитов, фенотип лимфоцитов.

Список исполнителей

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»
Федерального медико-биологического агентства
(ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России)**

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации

Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите населения от повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-социальной помощи

**Определение В-клеток и их субпопуляций с помощью проточной
цитофлуориметрии**

Методические рекомендации

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России МР.12 № 5 –2024

Заместитель директора по
клинической работе, главный врач,
д-р мед. наук, профессор



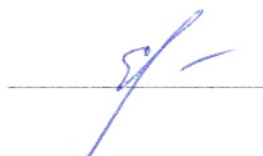
Ильина Н.И.

Заведующий лабораторией
клинической иммунологии,
д-р мед. наук



Пащенко М.В.

Старший научный сотрудник
лаборатории клинической
иммунологии, канд. биол. наук



Климова С.В.