Детская городская клиническая больница №9 им.Г.Н.Сперанского

БФУ имени И. Канта

ВЫСШАЯ МЕДИЦИНСКАЯ ШКОЛА

Проточная цитофлуориметрия и молекулярные методы в диагностике первичных иммунодефицитов

проф. ПРОДЕУС А.П.

Главный педиатр ДГКБ №9 им Г.Н. Сперанского,
Главный аллерголог-иммунолог МЗ МО,
Зав. Кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ВМШ

«Цена здоровья и качество лечения ощущаются после болезни….»
Денис Иванович Фонвизин

Внимание!
Больным,
ожидающим приема,
просьба не делиться
друг с другом
симптомами
заболевания.
Это затрудняет
постановку диагноза.
Спасибо всем
за понимание
ЭКГ обс
для воен
(до 18 лет в

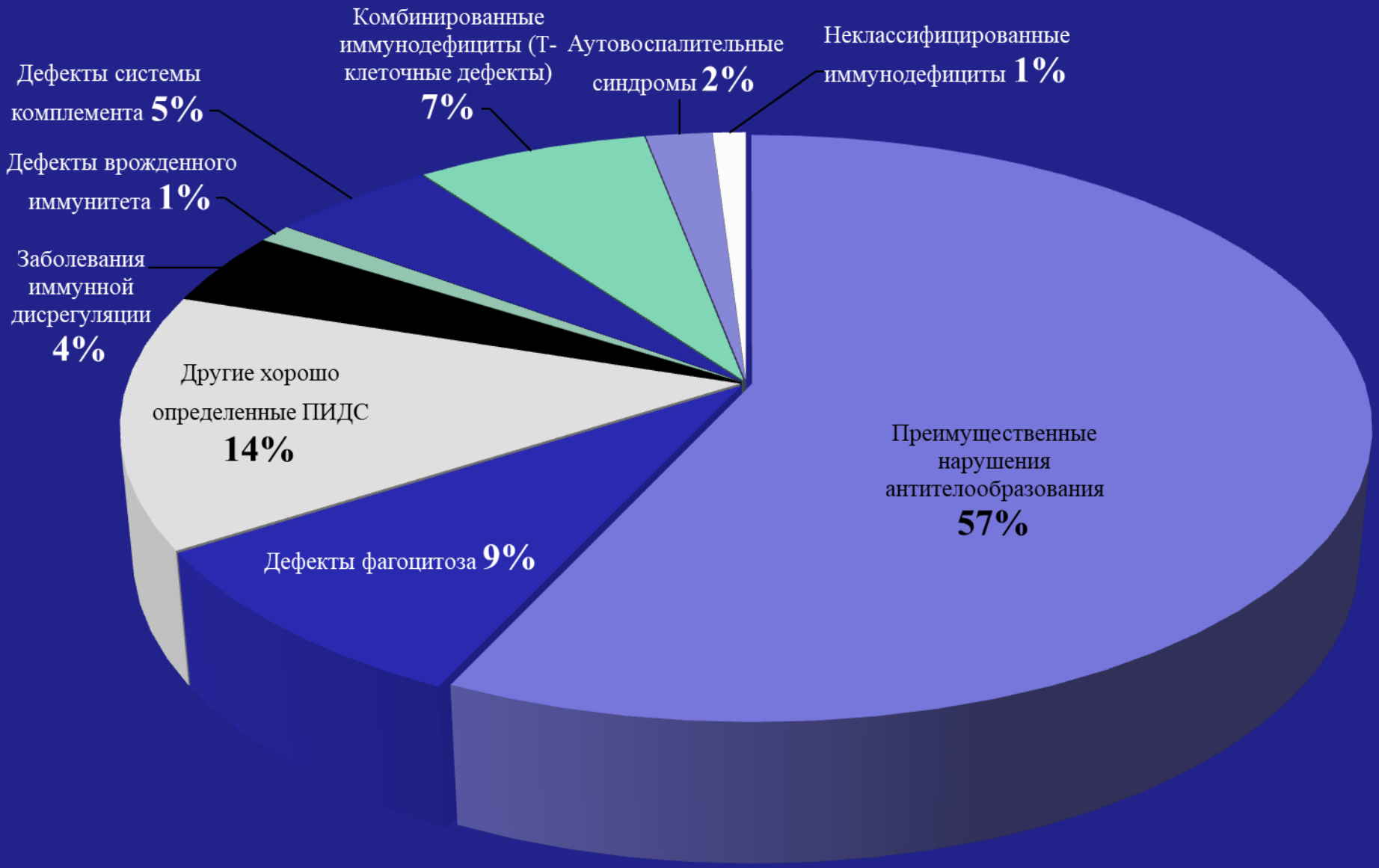
Знаете, дохтур...
Еще мне иногда кажется что человек разумен....
Я схожу с ума?
Я СХОЖУ С УМА
?!?

HELLO
YES, THIS IS
PROFESSOR DOG
quickmeme.com

Первичные иммунодефициты - гетерогенная группа генетических заболеваний, характеризующаяся высокой восприимчивостью к инфекциям, включая повышенную восприимчивость к отдельным микроорганизмам, склонность к аутоиммунным нарушениям, аллергическим, аутовоспалительным синдромам, малигнизации и иммунной дисрегуляции.

Классификация ПИД

- **Дефициты антителообразования (гуморальные или В-клеточные): агаммаглобуления, ОВИН, ОВИН-подобные синдромы (CARD11, PIK3CD, PRKCD, CTLA4, NFKB2)**
- **Комбинированные иммунодефициты (ТКИН и КИН)**
- **Комбинированные иммунодефициты с ассоциативными или синдромальными признаками (синдром Ди Джорджи, синдром Вискотта-Олдрича, атаксия телеангиэктазия, синдром Ниймеген, гипер IgE синдромы)**
- **Заболевания иммунной дисрегуляции (гемофагоцитарные лимфогистиоцитозы, IPEX синдром, CD25, STAT5b, IL10R дефициты, STAT2, STAT1 GOF, STAT3 GOF синдромы)**
- **Конгенитальные дефекты фагоцитов (тяжелая конгенитальная или циклическая нейтропении, ЛАД, ХГБ) и др. дефекты врожденного иммунитета (TLRs, NEMO)**
- **Аутовоспалительные заболевания (Семейная средиземноморская лихорадка и др.)**
- **Дефекты системы комплемента**
- **Фенокопии ПИД (а/т против IL17, IL22, соматическая мутация FAS)**

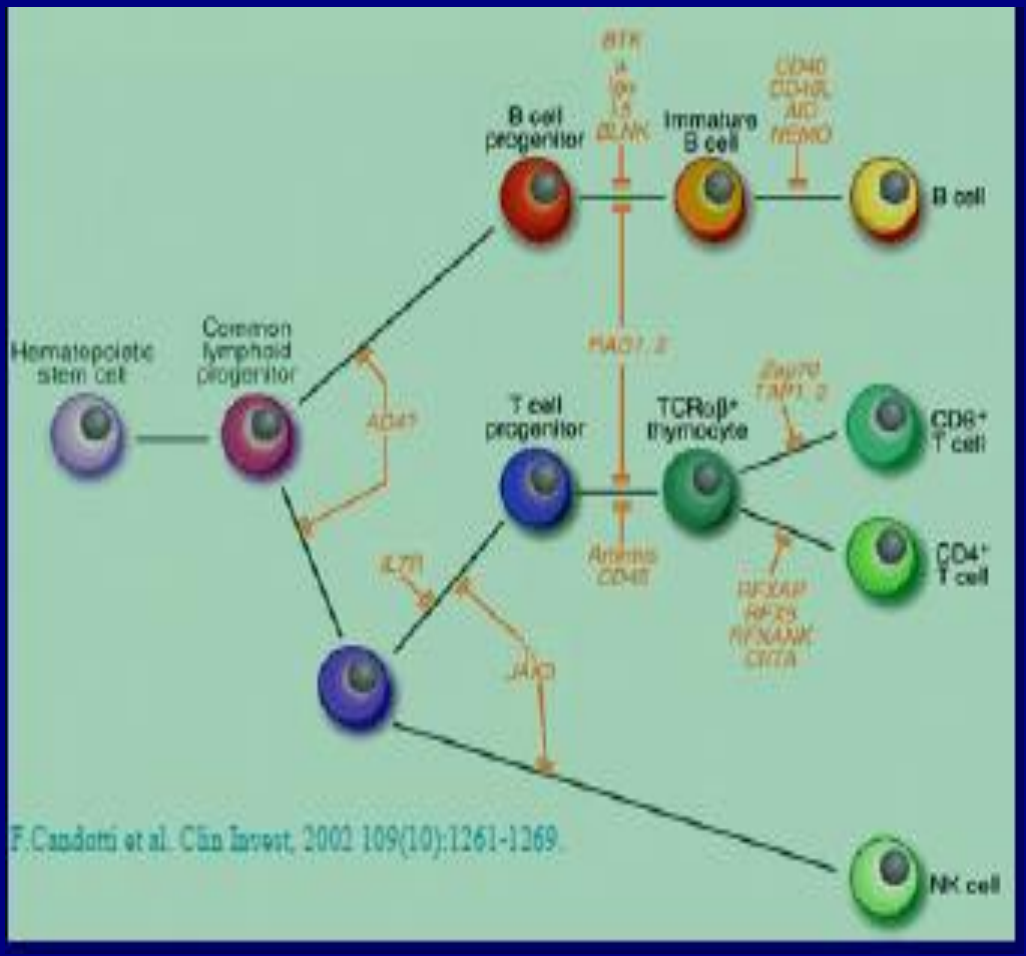


Данные из регистра ESID на 1 июня 2014 года

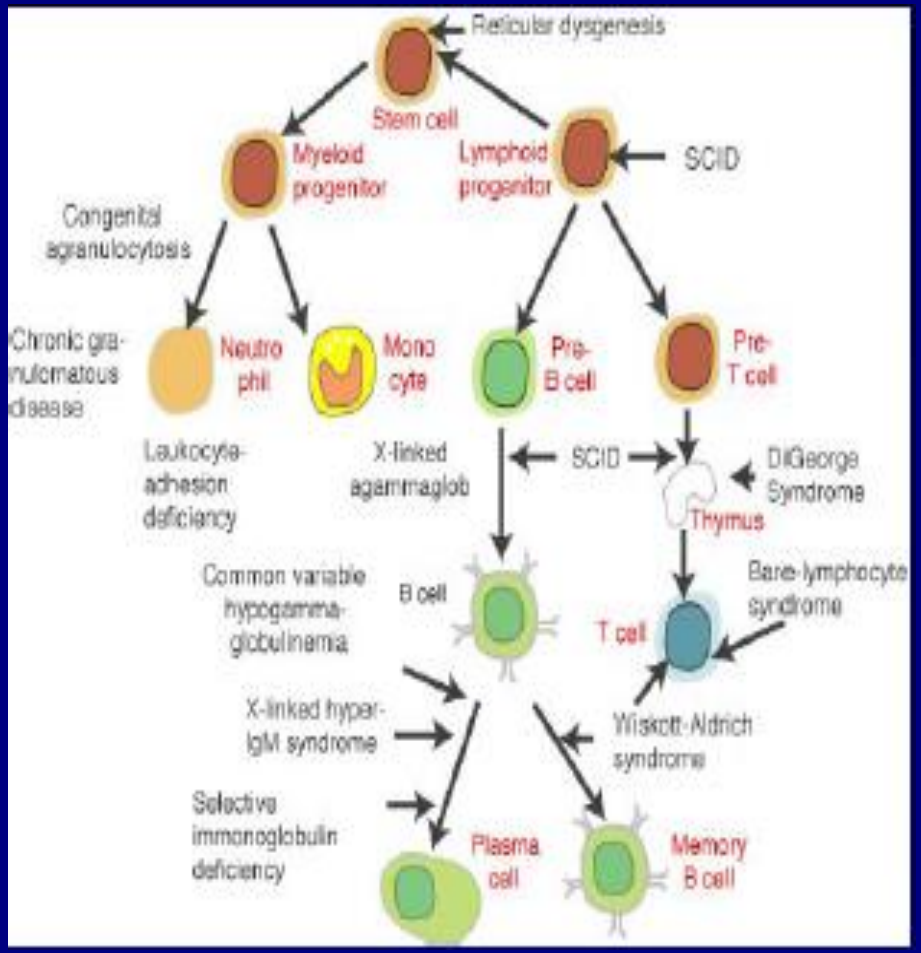
Гуморальные дефекты иммунной системы

- Х-сцепленная агаммаглобулинемия
- Гипер-IgM синдром
- Селективный IgA дефицит
- Дефицит субклассов IgG
- Дефект синтеза специфических антител
- Транзиторная младенческая гипогаммаглобулинемия

ПИД – заболевания, отражающие нарушения в развитии, созревании или функциях клеток иммунной системы



Сегодня известно более 200 врожденных нарушений и их количество растет с открытием новых генетических мутаций



Генетические дефекты при ПИД приводят к остановке развития Т и В клеток на разных стадиях

-НУ ВОТ! А ОБЕЩАЛИ, ЧТО РЖАТЬ НЕ БУДЕТЕ!
Хорошо еще, что я весь не вылез...
Sperli.net
kotomatrix.ru - Котоматрицы

Диагностика ПИД

- История болезни
- Физикальное обследование
- *Лабораторная диагностика:*

Оценка клеточного иммунитета

(фенотипирование и функциональные тесты)

Оценка гуморального иммунитета

и системы комплемента

Система фагоцитоза

Молекулярно-генетические исследования

Проточная цитометрия лежит в основе оценки клеточного иммунитета при первичных иммунодефицитах

- Лимфоцитарные субпопуляции
- Митогенная и антигенная активность (синтез цитокинов, экспрессия активационных маркеров)
- Пролиферация лимфоцитов: КФСЭ тест и др.
- Функции нейтрофилов:бурст тест, фаготест, хемотаксис, фенотип лейкоцитов (CD11a/CD18,
- CD11b/CD18, CD11c/CD18)
- Экспрессия специфических молекул

Специфические цитометрические тесты

Table 1 List of only those PIDs where screening diagnosis can be made by specific protein detection by flow cytometry

PID	Disease-specific protein detected by flow*
X-linked agammaglobulinemia (XLA)	Bruton's tyrosine kinase (Btk) in monocytes, platelets
Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) and related allelic variants, X-linked thrombocytopenia (XLT) and X-linked neutropenia/myelodysplasia	Wiskott-Aldrich Syndrome protein (WASP)
X-linked Hyper IgM syndrome (XL-HIGM)	CD40L (CD154) on activated T cells
Hyper IgM syndrome type 3	CD40 on B cells and/or monocytes
CVID-associated defects	ICOS (activated T cells), CD19, BAFF-R, TACI
Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (fHLH)	Perforin in NK cells and CD8 T cells
X-linked lymphoproliferative disease (XLP)	SAP (SH2D1A)
X-linked inhibitor of apoptosis (XLP2) disease	XIAP (BIRC4)
Chronic Granulomatous disease (CGD) - Autosomal recessive	p47phox, p67phox, p22phox in neutrophils
Leukocyte Adhesion deficiency type 1 (LAD-1)	CD18, CD11a, CD11b on leukocytes
Leukocyte Adhesion deficiency type 2 (LAD-2)	CD15 (Sialyl-Lewis ^{X}) on neutrophils and monocytes
Interferon gamma receptor 1 deficiency	IFNγR1
Interferon gamma receptor 2 deficiency	IFNγR2
IL-12 and IL-23 receptor β1 deficiency	IL-12Rβ1
STAT1 deficiency	pSTAT1
STAT5B deficiency	pSTAT5
Immunodeficiency, enteropathy, X-linked (IPEX)	FOXP3 on regulatory T cells (Tregs, CD4+CD25+FOXP3+)
Warts, Hypogammaglobulinemia, and myelokathexis (WHIM)	CXCR4 on T cells
Common gamma chain (cγ chain)	CD132 (IL-2RG, IL-4RG, IL-7RG, IL-9RG, IL-15RG) on activated T cells
Bare Lymphocyte Syndrome type I and II (BLS I and II)	MHC class I and II expression on monocytes, B cells and T cells (activated) respectively
CD25 deficiency (IPEX-like syndrome)	CD25 (IL2Rα)
Membrane cofactor protein (MCP) deficiency	CD46
Membrane attack complex deficiency (MAC)	CD59

*Presence of protein as detected by flow cytometry does not rule out an underlying functional mutation, therefore, results have to be correlated with other laboratory and immunological parameters, including functional flow cytometry when applicable, clinical and family history and confirmed by genetic testing for final diagnosis. Details of these individual defects can be found in "Immunologic Disorders in Infants and Children, 5th Ed, Eds. R. Stiehm, H. Ochs and J. Winkelstein, 2005, Elsevier Saunders).

Цитометрические тесты в лаборатории иммунологии ДГКБ №9 им. Г.Н. Сперанского

Фенотипирование лимфоцитов

- *Скрининг:* CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD(16+56)+, CD3+CD(16+56)+
- *Т-лимфоциты:* CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3+CD4+CD45RA+CD45RO-, CD3+CD4+CD45RA-CD45RO+, CD3+CD4+CD45RA+CD45RO+, CD3+CD4+CD25+CD127^{low}, CD3+TcR αβ+, CD3+TcR γδ+
- *В-лимфоциты:* CD19+CD5+, CD19+CD27+IgD+, CD19+CD27+IgD-, CD19+CD27-IgD+, CD19+CD21^{low}, CD19+CD38+++IgM+++, CD19+CD38+++IgM^{low}, CD19+CD21^{low}CD38^{low}
- *ЕКК:* CD3-CD(16+56)+, CD3-CD16+56+, CD3-CD56+CD57+

Активационные маркеры:
CD3+HLA DR+, CD3+CD25+, CD3+CD8+CD38+

Фунциональные тесты:

ФГА стимулированный CD69, CD40L,

ИЛ-6 стимулированный STAT3,

ФМА стимулированные IL17, INFγ, TNFα

Активность фагоцитов:
поглощение меченых бактерий, Бурст-тест

Специфические маркеры: WASp, CD40L

Детская городская клиническая больница N9 им.Г.Н.Сперанского

Клинико-диагностическая лаборатория

Ф.И.О. пациента: [redacted] *№ и/б:* **б-ца...**

Пол: **Неизве...** *Реф.гр.:* *Дата рожд.:* **20.06.2006** *Категория:* **Амбулаторн.** *IDp:* 00444756

Результаты исследования

Лист № 1 из 1

Отделение: **Иммунопатология** *Дата печати:* **21.02.2014 17:33** *IDs:* 027055 R

Тип материала: **Венозная кровь** *Дата регистрации:* **13.02.2014 16:04** *Дата выполнения:* **14.02.2014 14:40**

Место взятия: .

Откл.	Тест	Результат	Ед.измерения	Референтный интервал
	Иммунологическое исследование			
	Лейкоциты	15950	кл/мкл	(6100.00-11400.0)
	Эритроциты	3.97	10^6/мкл	
	Гемоглобин	95	г/л	
	Гематокрит	30.9	%	
	Тромбоциты	247	10^3/мкл	
	Лимфоциты	8	%	(36.00-43.00)
	Лимфоциты(абс)	1276	кл/мкл	(2000.00-2700.00)
	Гранулоциты	88	%	(37.00-61.00)
	Гранулоциты(абс)	14036	кл/мкл	(1520.00-6060.00)
	Моноциты	4	%	(2.00-7.00)
	Моноциты(абс)	638	кл/мкл	(0.00-800.00)
	CD3+(Т-лимфоциты)	28	%	(66.00-76.00)
	CD3+(Т-лимфоциты)(абс)	357	кл/мкл	(1400.00-2000.00)
	CD3+CD4+(Т-хелперы)	19	%	(33.00-41.00)
	CD3+CD4+(Т-хелперы)(абс)	242	кл/мкл	(700.00-1100.00)
	CD3+CD8+(Т-цитотокс.лимф.)	9	%	(27.00-35.00)
	CD3+CD8+(Т-цитотокс.лимф.)(абс)	115	кл/мкл	(600.00-900.00)
	CD19+(В-лимфоциты)	64	%	(12.00-22.00)
	CD19+(В-лимфоциты)(абс)	817	кл/мкл	(300.00-500.00)
	CD3-CD(16+56+)(НК-клетки)	9	%	(4.00-26.00)
	CD3-CD(16+56+)(НК-клетки)(абс)	115	кл/мкл	(96-1330)
	CD3+CD(16+56+)(Т-НК-клетки)	5	%	(0.00-10.00)
	Т-хелперы/Т-цитотокс(Иммун. индекс)	2.11		(1.10-1.40)
	IgM	1.87	г/л	(0.80-1.90)
	IgG	8.37	г/л	(7.00-11.80)
	IgA	2.37	г/л	(0.90-1.90)

Ответственный: **Смирнова А.С.,Сидорова Л.Н.**

Клинико-диагностическая лаборатория

Ф.И.О. пациента: [redacted] № и/б: IDp: 00450645

Пол: Неизве... Дата рожд.: 08.04.2010 Категория: Амбулаторн. Лист № 1 из 2

Результаты исследования

Дата печати: 19.03.2014 16:27 IDs: 027289 R

Отделение: КДО Дата регистрации: 18.03.2014 15:03 Дата выполнения: 19.03.2014 16:04

Тип материала: Венозная кровь

Место взятия: .

Откл.	Тест	Результат	Ед.измерения	Референтный интервал
	Иммунологическое исследование			
	Лейкоциты	4930	кл/мкл	(6100.00-11400.0)
	Эритроциты	4.38	10^6/мкл	
	Гемоглобин	117	г/л	
	Гематокрит	36.8	%	
	Тромбоциты	290	10^3/мкл	
	Лимфоциты	54	%	(38.00-64.00)
	Лимфоциты(абс)	2662	кл/мкл	(2400.00-5810.00)
	Гранулоциты	40	%	(37.00-61.00)
	Гранулоциты(абс)	1972	кл/мкл	(1520.00-6060.00)
	Моноциты	6	%	(2.00-7.00)
	Моноциты(абс)	296	кл/мкл	(0.00-800.00)
	CD3+(Т-лимфоциты)	68	%	(62.00-80.00)
	CD3+(Т-лимфоциты) (абс)	1810	кл/мкл	(1610.00-4230.00)
	CD3+CD4+(Т-хелперы)	34	%	(35.00-51.00)
	CD3+CD4+(Т-хелперы) (абс)	905	кл/мкл	(900.00-2860.00)
	CD3+CD8+(Т-цитотокс.лимф.)	26	%	(22.00-38.00)
	CD3+CD8+(Т-цитотокс.лимф.) (абс)	692	кл/мкл	(630.00-1910.00)
	CD19+(В-лимфоциты)	22	%	(21.00-28.00)
	CD19+(В-лимфоциты) (абс)	586	кл/мкл	(700.00-1300.00)
	CD3-CD(16+56+) (НК-клетки)	7	%	(4.00-23.00)
	CD3-CD(16+56+) (НК-клетки) (абс)	186	кл/мкл	(96-1330)
	CD3+CD(16+56+) (Т-НК-клетки)	39	%	(0.00-10.00)
	Т-хелперы/Т-цитотокс(Иммун. индекс)	1.31		(1.00-2.10)
	CD3+HLA DR+(активир. Т-лимф.)	1.4	%	(3.00-13.00)
	CD3-HLA DR+(активир. В-лимф. и НК)	24	%	(5.00-20.00)
	CD3-HLA DR+(акт. В-лимф. и НК)(абс)	639	кл/мкл	(60-600)
	Поглотительная акт-ть гранулоцитов	94	%	(82.00-90.00)
	Поглотительная активность моноцитов	93	%	(75.00-85.00)
	Контр. CD3+CD69+(актив. Т-лимф.)	6 (9)		
	Контр. CD3-CD69+(акт. В-лимф. и НК)	9	%	
	Субмакс.конц.ФГА(актив. Т-лимф.)	47 (74)		
	Субмакс.конц.ФГА(акт. В-лимф. и НК)	28	%	
	Макс.конц.ФГА(актив. Т-лимф.)	42 (86)		
	Макс.конц.ФГА(акт. В-лимф. и НК)	45	%	
	CD19+CD5+ (В1) отн. лимф.	4.9	%	(0.5 - 2.1)
	CD19+CD5+ (В1) абс.отн.лимф	130	кл/мкл	(22-115)
	CD19+CD5+ (В1) отн. CD19+	18.2	%	(4.1 - 17.5)
	CD19+CD27+ (В-кл.памяти) отн.лимф	17.0	%	(1.8 - 6.8)
	CD19+CD27+ (В-кл.памяти) отн. CD19+	69.4	%	(22.8-39.7)
	CD19+CD27+ (В-кл.памяти) абс.отн.ли	453	кл/мкл	(12 - 40)
	CD3+CD25+ (акт.Т-лим)отн. лимф	10.0	%	(0.5-6.0)
	CD3+CD25+ абс.отн.лимф	266	кл/мкл	(7-165)
	CD3-CD25+ (акт.В-лим и НК)отн. лимф	4.7	%	
	CD3-CD25+ абс.отн. лимф	125	кл/мкл	
	CD3+альфа/бета Т-лимф. отн. лимф	59.6	%	(60.8-80.2)
	CD3+альфа/бета Т-лимф. отн.CD3+	89.7	%	(87.2-98.4)
	CD3+альфа/бета Т-лимф. абс.отн.лимф	1587	кл/мкл	(924-1964)
	CD3+гамма/дельта Т-лимф. отн. лимф.	8.1	%	(1.8-7.4)
	CD3+гамма/дельта Т-лимф. отн. CD3	11.8	%	(1.7-12.6)

Детская городская клиническая больница №9 им.Г.Н.Сперанского

Клинико-диагностическая лаборатория

Ф.И.О. пациента: [redacted] № и/б:

Пол: Неизве... Дата рожд.: 08.04.2010 Категория: Амбулаторн. IDp: 00450645

Результаты исследования (продолжение)

Лист № 2 из 2

Дата печати: 19.03.2014 16:27 IDs: 027289 R

Отделение: КДО Дата регистрации: 18.03.2014 15:03 Дата выполнения: 19.03.2014 16:04

Тип материала: Венозная кровь

Место взятия: .

Откл.	Тест	Результат	Ед.измерения	Референтный интервал
	CD3+гамма/дельта Т-лимф.абс.отн.лим	216	кл/мкл	(22-115)
	CD4+CD25+CD127- (Т-рег.кл) отн.лимф	3.9	%	(0.6-1.1)
	CD4+CD25+CD127- (Т-рег.кл) отн.CD4+	6.8	%	(1.65-5.75)
	CD4+CD25+CD127- (Т-рег.кл) абс.отн.	104	кл/мкл	(9-78)
	CD4+CD45RA+ (наивные Т-кл)отн. лимф	25.9	%	(20-40)
	CD4+CD45RA+ (наивные Т-кл)отн. CD4	69.5	%	
	CD4+CD45RA+ (наивные Т-кл)абс.отн.л	689	кл/мкл	
	CD4+CD45RO+ (Т-кл.памяти) отн. лимф	15.7	%	(272-1123)
	CD4+CD45RO+ (Т-кл.памяти) отн. CD4+	49.0	%	(5-25)
	CD4+CD45RO+ (Т-кл.памяти) абс.отн.л	418	кл/мкл	
	CD8CD38 (акт.цит.лимф.) отн. лимф.	21.2	%	(68-702)

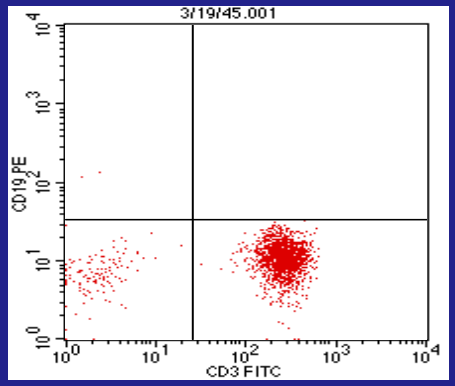
Ответственный: Смирнова А.С.

ОТ ЖАДНОСТИ® 300
30 таблеток, покрытых оболочкой, 300 мг
Для приема внутрь

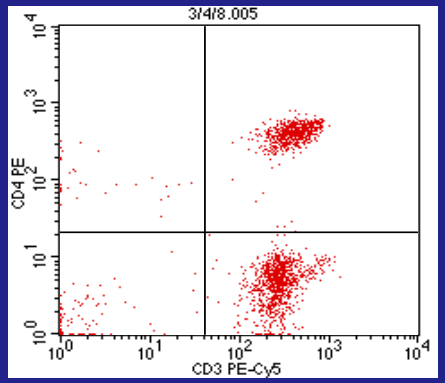
Примеры применения диагностических алгоритмов ПИД в нашей практике

Гуморальные (В-клеточные) иммунодефициты

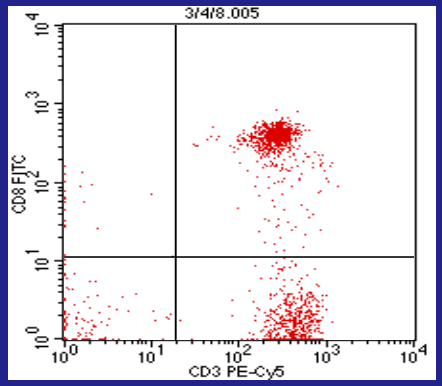
X-сцепленная агаммаглобулинемия



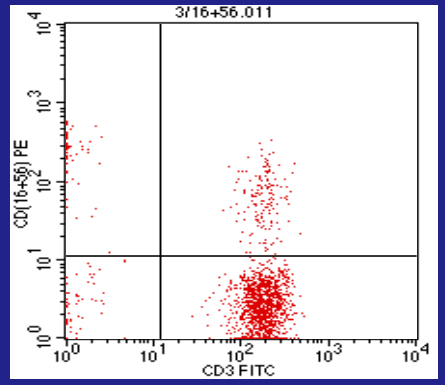
CD19=0,1%



CD3CD4=38%



CD3CD8=51%



CD3-CD(16+56)=4%

Диагностические критерии

1. Пациенты мужского пола с уровнем В-лимфоцитов менее, чем 2%
2. Тяжелая редукция всех изотипов иммуноглобулинов
3. Мутация в Btk гене (тирозинкиназа Брутона)
4. Отсутствие мРНК и белка Btk в лимфоцитах и моноцитах
5. Сниженный уровень В-лимфоцитов (<2%) у родственников мужского пола по материнской линии (дяди, кузены, племянники)

Хронические заболевания легких, нейродегенеративные процессы неясной этиологии

Агаммаглобулинемия

№		пол	CD3 %	CD19 %	NK %	**IgG г/л**	IgA г/л	IgM г/л	TREC Коп/10^6	KREC Коп/10^6
Pt1	13л	м	92	0	5	<1,4	0,02	<0,05	2,2E+05	отр
Pt2	13л	м	88	0	11	6,16	<0,05	<0,05	4,8E+04	отр
Pt3	14л	м	80	0	15	<1,08	<0,05	<0,05	5,7E+03	отр
Pt4	11л	м	94	0	3	7,20	0,07	<0,05	3,6E+05	отр
Pt5	?	м	81	0	12	4,15	<0,05	<0,05	1,9E+05	отр
N	10-16л	-	66-76	12-22	6-27	8,2-10,7	1,0-2,3	0,6-2,0	2,3E+03 - 2,5E+05	1,0E+03 - 1,0E+05

Общий вариабельный иммунодефицит (ОВИН)

- *Диагностические критерии*

1. *Пациенты муж. или жен. пола с тяжелой редукцией IgG и IgA (2SD ниже среднего) и с нормальным, низким или очень низким количеством B-лимфоцитов.*

2. *Обычно с поздним началом (старше 2 лет)*

3. *Слабый ответ на вакцинацию (низкий уровень специфических Ig)*

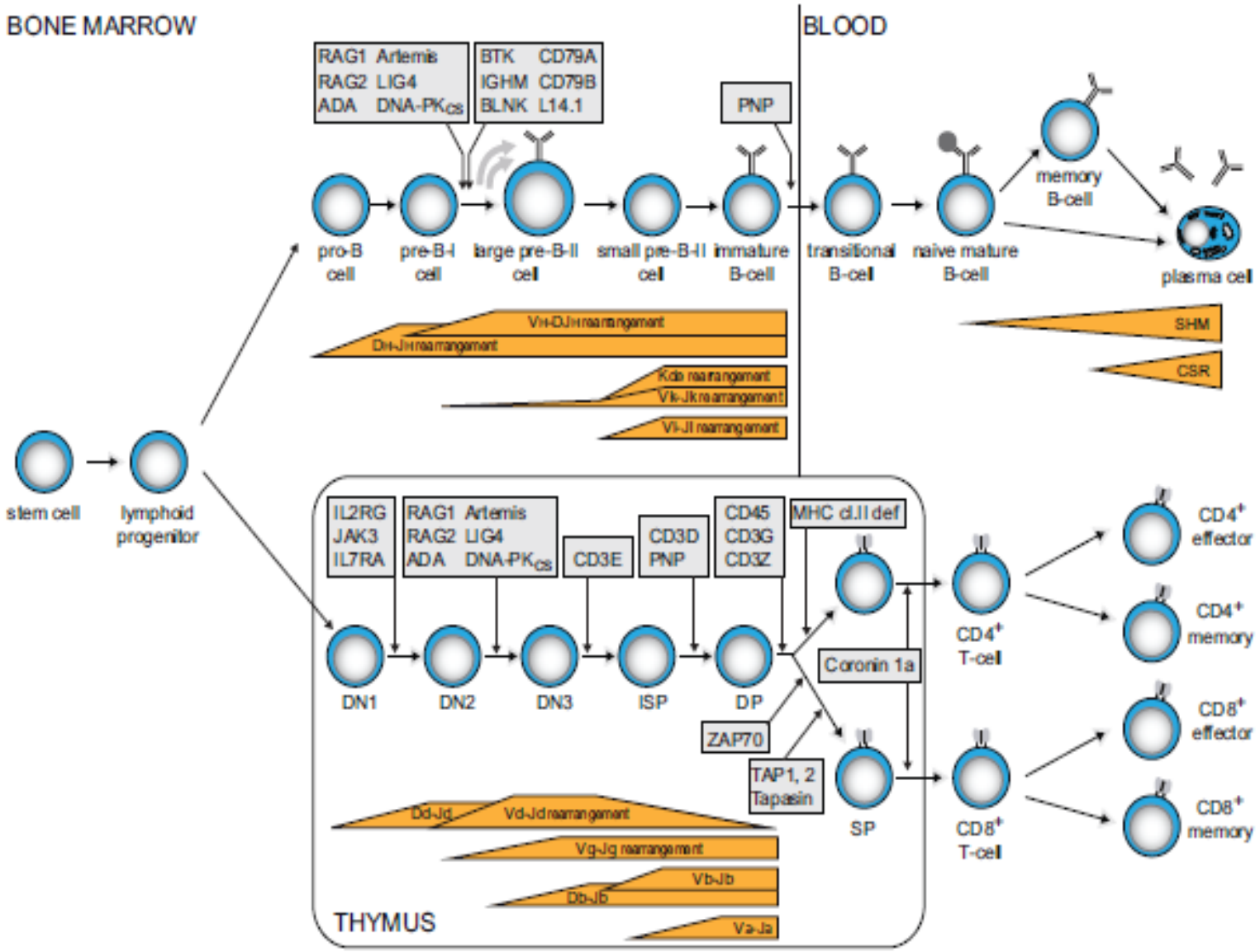
4. *Исключение других случаев гипогаммоглобулинемии*

- *Существует несколько различных клинических фенотипов (тип B+/B-, тип smB+/smB-)*
- *Вариабельная генетика: ICOS, CD19, CD21, TACI (AD,AR), BAFF-R, Msh5, CD27, hypomorphic Rag1*
- *Рецидивирующие инфекции, повышен риск аутоиммунных заболеваний и злокачественных новообразований, гранулем, заболеваний ЖКТ (лямблии, колиты, криптоспоридии).*

Общий вариабельный иммунодефицит

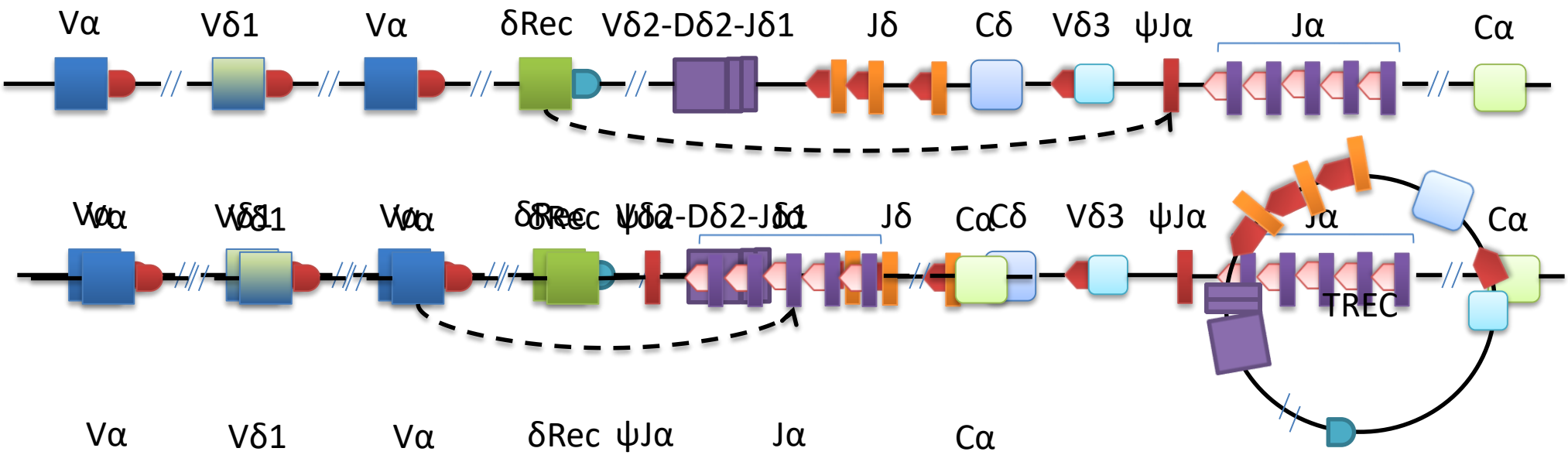
			лимф. абс	CD3 %	CD4 %	CD8 %	CD4/ CD8	CD19 %	NK %	TREC коп/10^5	KREC коп/10^5
Pt1	17л	ж	1860	85	31	51	0,6	11	3	2,2E+04	3,2E+02
Pt2	10л	ж	2542	77	33	36	0,9	13	8	9,9E+03	7,6E+02
Pt3	5л	м	1900	64	31	15	2,0	8	28	2,7E+04	3,5E+01
Pt4	16л	м	164	73	24	41	0,8	2	15	отр	2,2E+01
Pt5	14л	м	905	71	18	49	0,4	9	15	1,9E+03	1,9E+03
Pt6	4г	м	2684	76	50	22	2,3	7	14	8,3E+04	1,4E+02
Pt7	17л	м	960	68	19	41	0,5	6	14	2,3E+02	1,1E+02
Pt8	11л	м	2657	37	20	24	0,8	7	40	2,5E+04	2,2E+03
Pt9	13л	м	2310	83	17	57	0,3	5	8	8,8E+02	1,6E+03
Pt10	11л	м	2272	52	23	23	1,0	16	28	1,9E+04	5,4E+03
N	10-16л		>2000	66-76	33-41	27-35	1,1-1,4	12-22	6-27	2,3E+03 - 2,5E+05	1,0E+03 - 1,0E+05

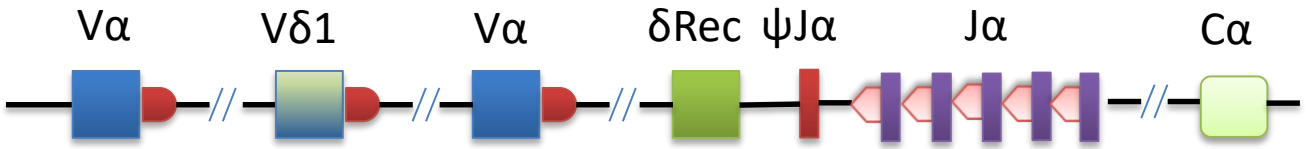
ХОМЯК
УРАЛЬСКИЙ



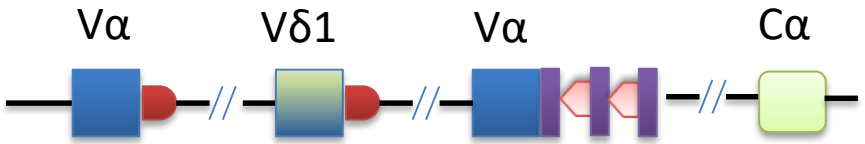
Дифференцировка Т и В лимфоцитов с этапом реаранжировки Т и В клеточных рецепторов и генетические дефекты, приводящие к развитию ПИД.

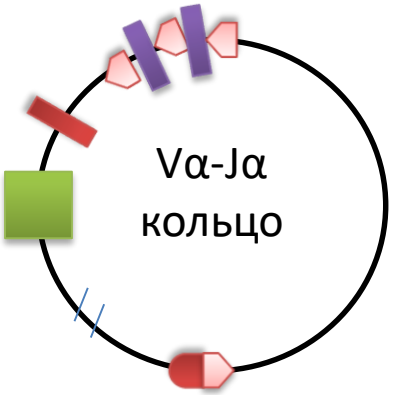
Созревание Т-клеточного рецептора и TREC



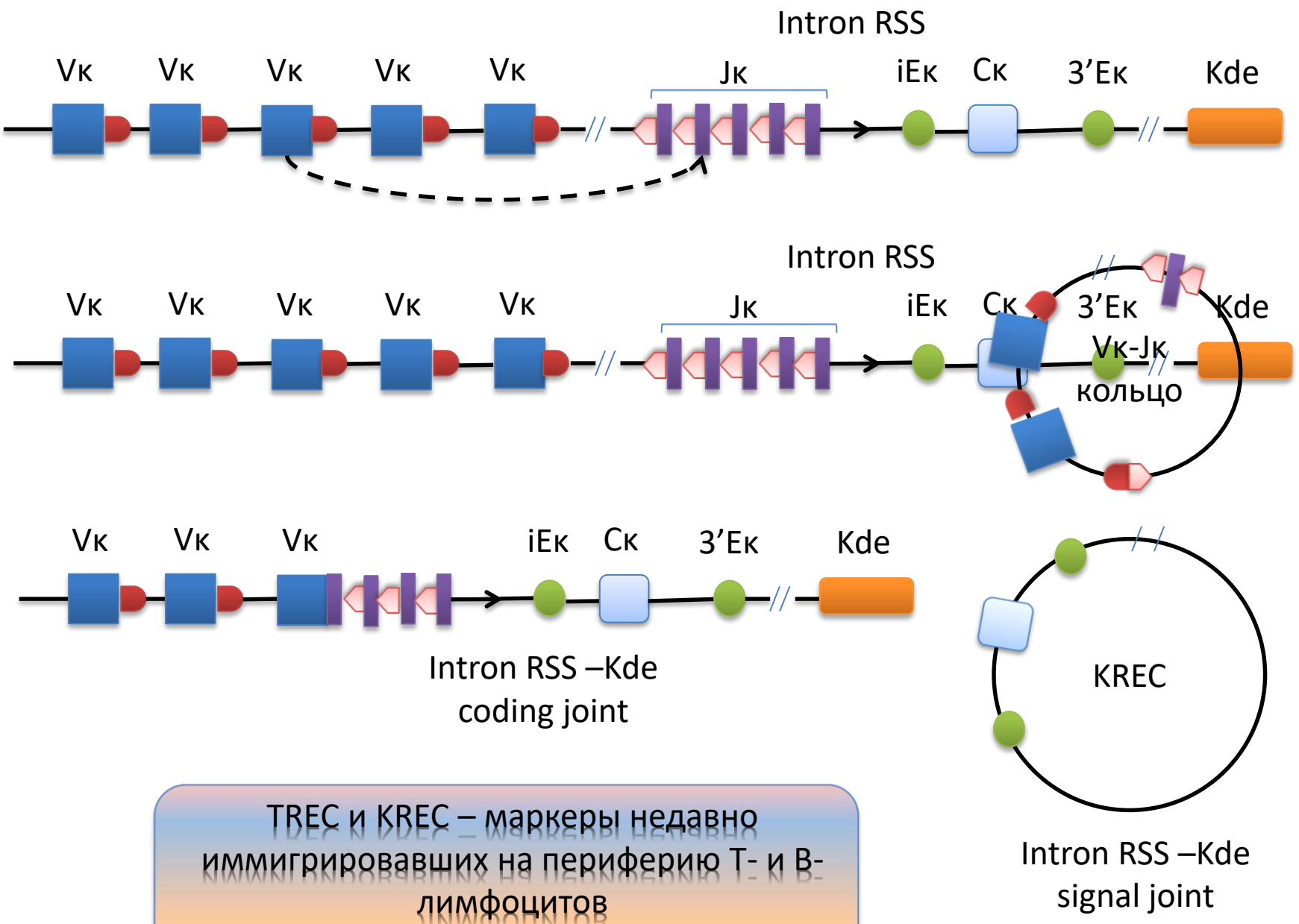


Vκ – Jκ coding joint





Созревание В-клеточного рецептора и KREC



TREC и KREC – маркеры недавно иммигрировавших на периферию Т- и В-лимфоцитов

Дизайн тест-системы

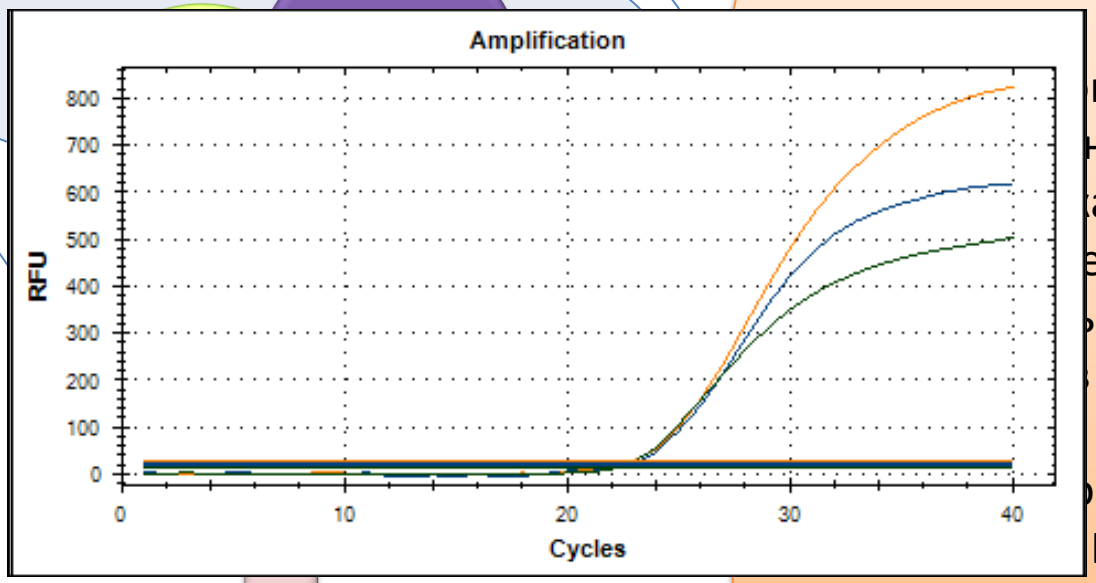
Мишени для подбора праймеров и флуоресцентно-меченых зондов

Каналы детекции сигнала

Fam/Green

Joe/Hex/VIC/Yellow

Rox/Orange



Мультиплексная количественная ПЦР

нтроль –
на ALB
а:
е ложно-
ьных
ости
НК

Калибраторы: линеаризованные плазмиды, содержащие целевые фрагменты, с известной концентрацией

Способ экстракции НК: автоматический – Prepito, PerkinElmer
Ручной – «РИБО-преп», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии

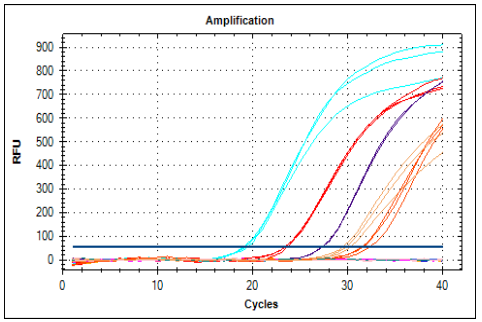
Материал для исследования: цельная кровь

Метод - ПЦР в реальном времени

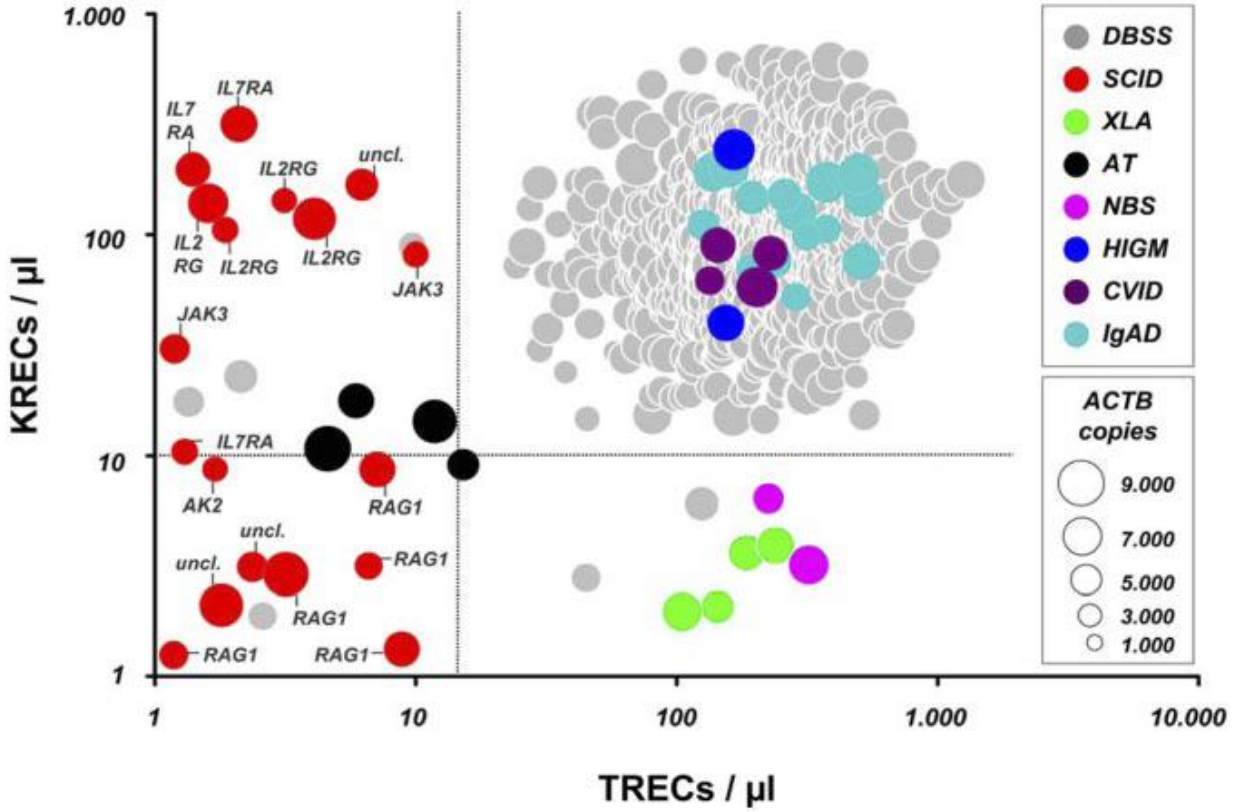
Цельная кровь или сухие пятна крови

Выделение ДНК

Амплификация



Детекция флуоресценции

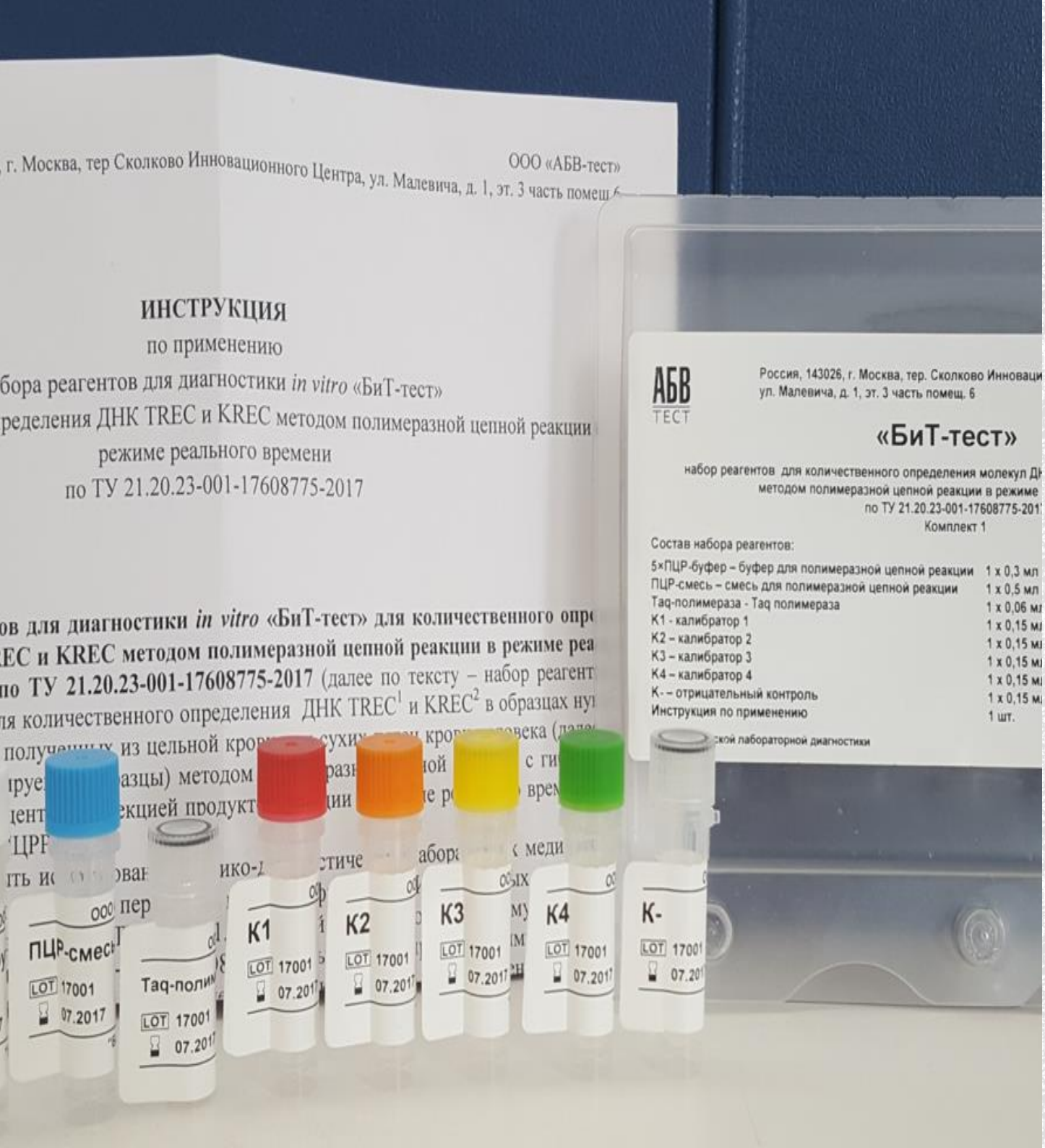


Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR

Stephan Borte et all, Blood. 2012

2560 анонимных карт + 49 ПИД

6 детей с аномальными TREC/KREC (0,23%)



МЫ ПРЕДЛАГАЕМ

- ПЦР в режиме реального времени
- Стандартная методика
- Прост в интерпретации
- Конечная цена - около 1000 рублей/анализ

Детская городская клиническая больница N9 им.Г.Н.Сперанского

Клинико-диагностическая лаборатория

Ф.И.О. пациента: *№ и/б:*

Пол: *Дата рожд.:* 13.11.2017 *Категория:* Амбулаторн. *IDp:*

Результаты исследования

Лист № 1 из 1

Отделение: **Иммунопатология** *Дата печати:* **19.01.2018 09:58** *IDs:* 007955 R

Тип материала: **Венозная кровь** *Дата регистрации:* **15.01.2018 10:40** *Дата выполнения:* **19.01.2018 09:57**

Место взятия: .

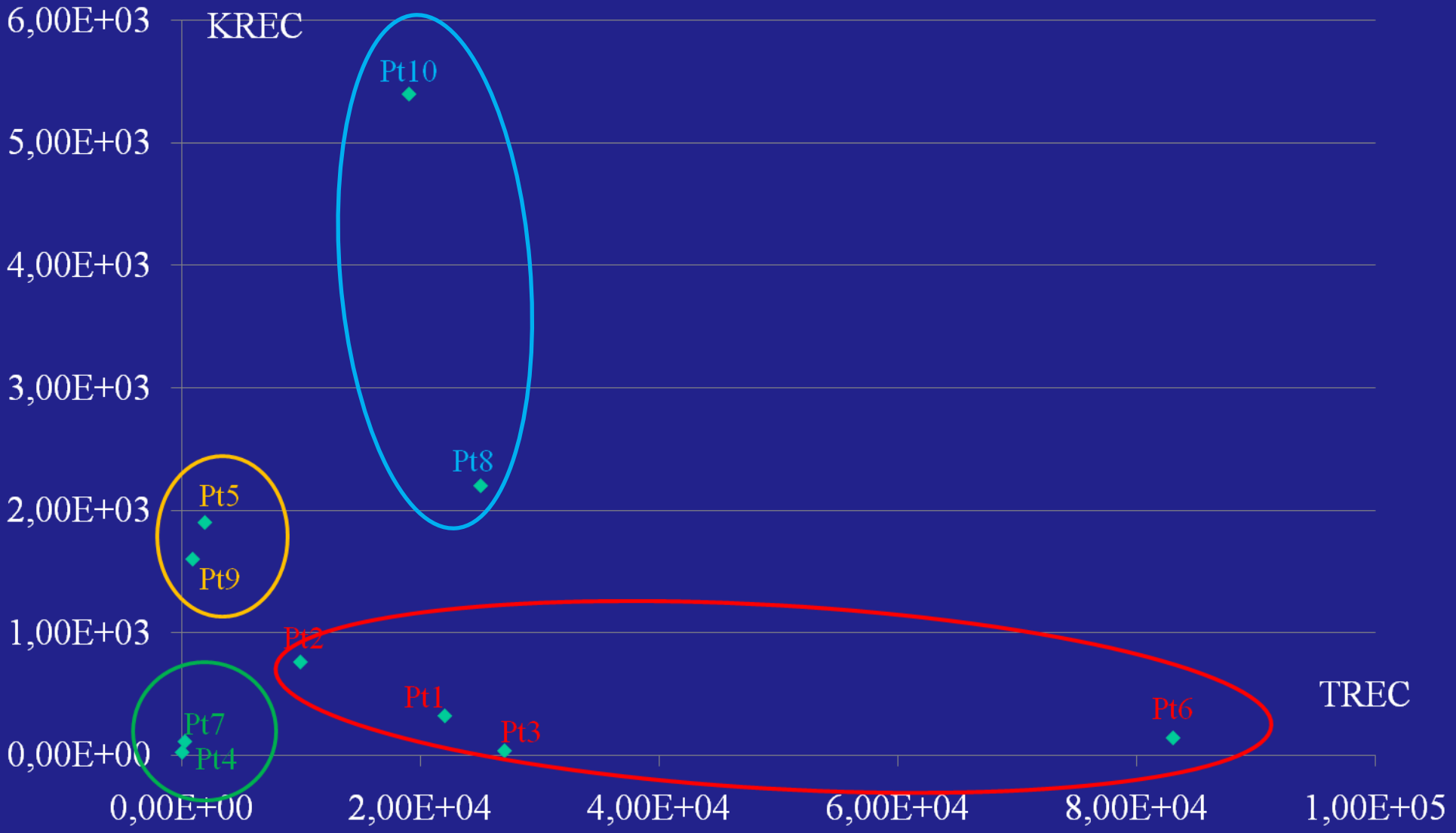
Откл.	*Тест*	*Результат*	*Ед.измерения*	*Референтный интервал*
	Иммунологическое исследование			
	TREC	0		
	Нормы результатов (мин -макс) по возрастам: до 1 года 1.2*10^5 - 1.6*10^5 1 - 6 лет 1.4*10^4 - 3.9*10^5 6 - 12 лет 7.3*10^3 - 7.9*10^4 12 - 18 лет 2.3*10^3 - 2.5*10^4			
	KREC	0	коп/10^5	
	Норма результата для детей до 18 лет вне зависимости от пола 1.0*10^3 - 1.0*10^5			

Ответственный: **Гордукова М.А.**

Общий вариабельный иммунодефицит

			лимф. абс	CD3 %	CD4 %	CD8 %	CD4/ CD8	CD19 %	NK %	TREC коп/10^5	KREC коп/10^5
Pt1	17л	ж	1860	85	31	51	0,6	11	3	2,2E+04	3,2E+02
Pt2	10л	ж	2542	77	33	36	0,9	13	8	9,9E+03	7,6E+02
Pt3	5л	м	1900	64	31	15	2,0	8	28	2,7E+04	3,5E+01
Pt4	16л	м	164	73	24	41	0,8	2	15	отр	2,2E+01
Pt5	14л	м	905	71	18	49	0,4	9	15	1,9E+03	1,9E+03
Pt6	4г	м	2684	76	50	22	2,3	7	14	8,3E+04	1,4E+02
Pt7	17л	м	960	68	19	41	0,5	6	14	2,3E+02	1,1E+02
Pt8	11л	м	2657	37	20	24	0,8	7	40	2,5E+04	2,2E+03
Pt9	13л	м	2310	83	17	57	0,3	5	8	8,8E+02	1,6E+03
Pt10	11л	м	2272	52	23	23	1,0	16	28	1,9E+04	5,4E+03
N	10-16л		>2000	66-76	33-41	27-35	1,1-1,4	12-22	6-27	2,3E+03 - 2,5E+05	1,0E+03 - 1,0E+05

Общий вариабельный иммунодефицит

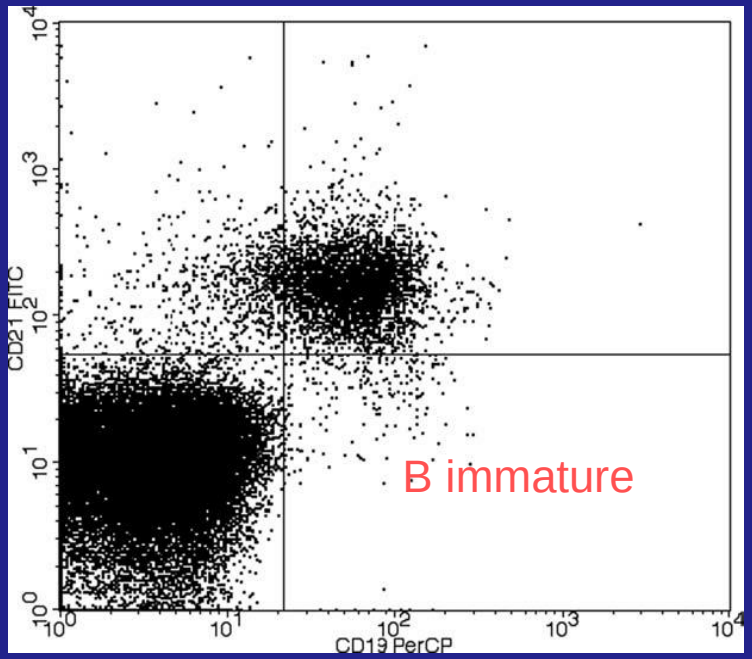


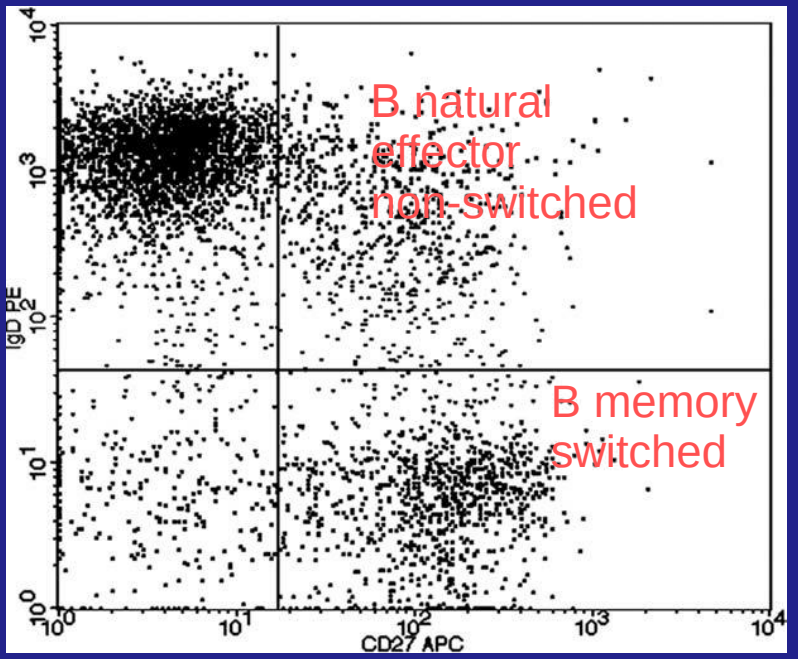
Дифференцировка В-лимфоцитов

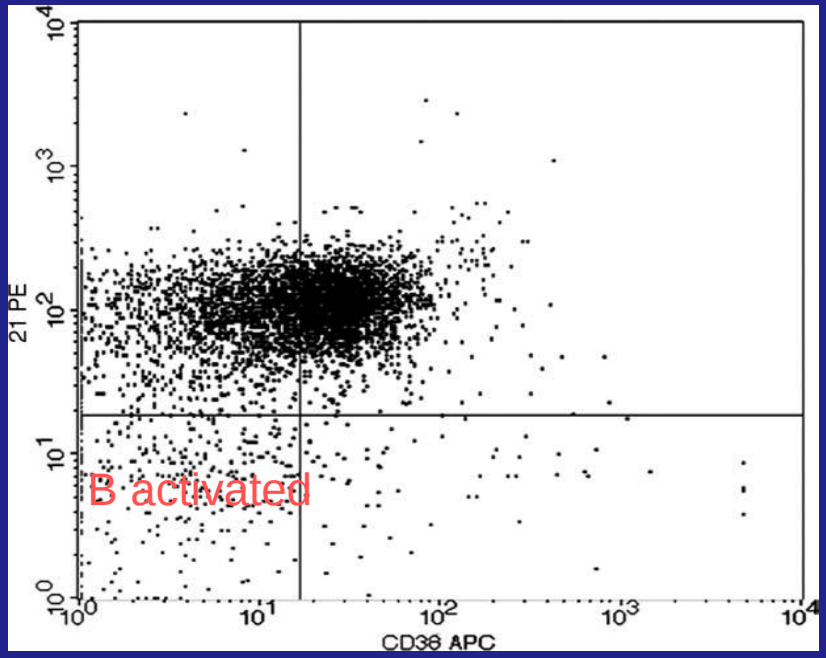
Table III Schematic representation of detected potential B-cell differentiation blocks in the study group in context of currently known B-cell maturation defects

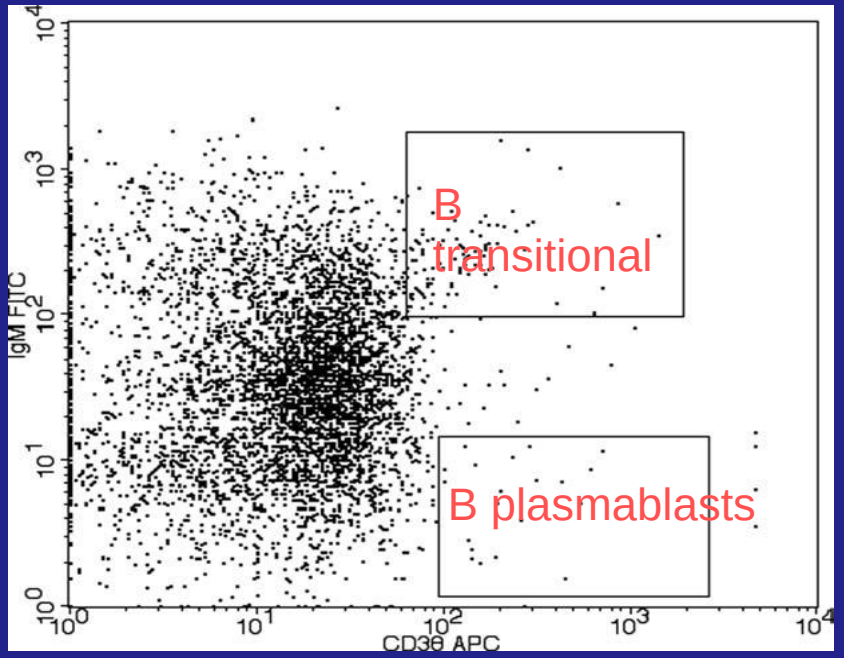
	Bone marrow				Peripheral bloodcsl					
Putative developmental block		I ↓			II ↓	III ↓	IV ↓	V ↓	VI ↓	
B cell subset	Pro-B	Pre-BI	Pre-BII	Immature	Transitional	Naïve	Natural effector	Memory	Plasmablast	
Phenotype	$CD22^+$	$CD22^+$	$CD22^+$	$CD22^+$	$CD19^+$	$CD19^+$	CD19+	$CD19^+$	$CD19^+$	
	$CD34^+$	$CD34^+$	$CD34^-$	$CD34^-$	IgM^{++}	IgD^+	IgD +	IgD^-	IgM^-	
	$CD19^-$	$CD19^+$ $cTdT^+$	$CD19^+$ $cTdT^-$ $cIgM^+$ $sIgM-$	$CD19^+$ $cTdT^-$ $cIgM^+$ $sIgM^+$	$CD38^{++}$	$CD27^-$	CD27+	$CD27^+$	$CD38^{++}$	
Currently known defects		BTK IGHM BLNK CD79A CD79B LI4.1				BAFFR	CD19 CD81 CD21 CD20		AID UNG PMS2 CD40 CD40L ICOS TACI	

J. Clin. Immunol (2013) 33:731-741



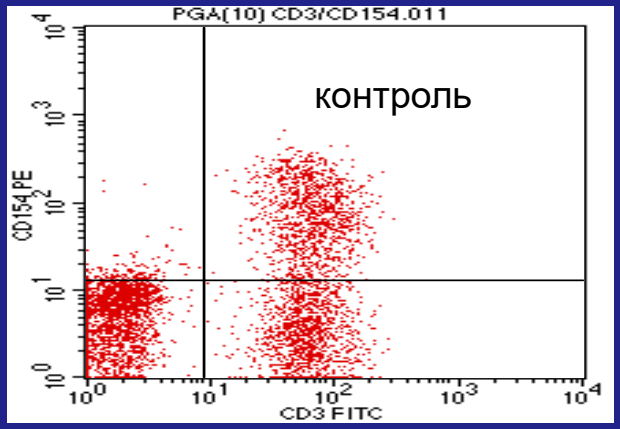




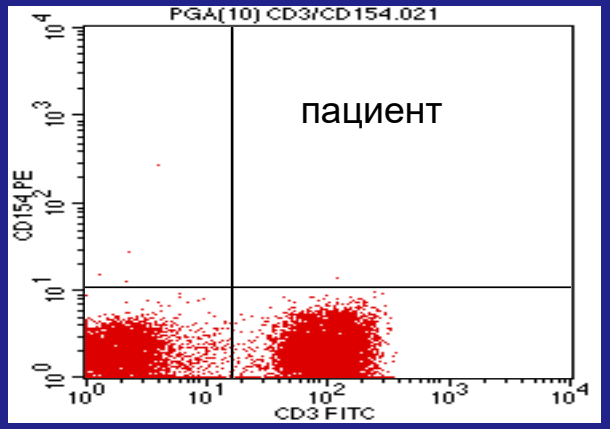


J. Clin. Immunol (2013) 33:731-741

X-сцепленный гипер IgM синдром



CD3+CD40L+=24%



CD3+CD40L+=0%

Диагностические критерии

Пациенты мужского пола с концентрацией IgG по крайней мере на 2SD ниже нормы и одним из следующих признаков:

1. Нормальный уровень Т-лимфоцитов и нормальный митогенный ответ Т-лимфоцитов
2. Нормальное или повышенное количество В-лимфоцитов, но отсутствие антиген-специфических антител
3. Одна или более бактериальные инфекции: рецидивирующие инфекции в первые 5 лет жизни; Pneumocystis carinii в первый год жизни; нейтропения; диарея вызванная Cryptosporidium, Sclerosing cholangitis, апластическая анемия, вызванная Parvovirus
4. Отсутствие экспрессии CD40L(CD154) на активированных CD4+ Т-клетках.

Другие иммунодефицитные синдромы

Синдром Ди Джорджи

Диагностические критерии

Сниженное или нормальное количество циркулирующих Т-лимфоцитов, нормальное или повышенное количество В-лимфоцитов, уровень иммуноглобулинов нормальный или сниженный.

- Аутосомно-доминантно наследуемые или спорадические делеции в 22 хромосоме (22q11-pter(или 10p).

Агенезия или дисгенез паращитовидной железы, аплазия тимуса, черепно-лицевые дисморфии, дефекты аорты, пороки сердца, рецидивирующие вирусные, грибковые и бактериальные инфекции.

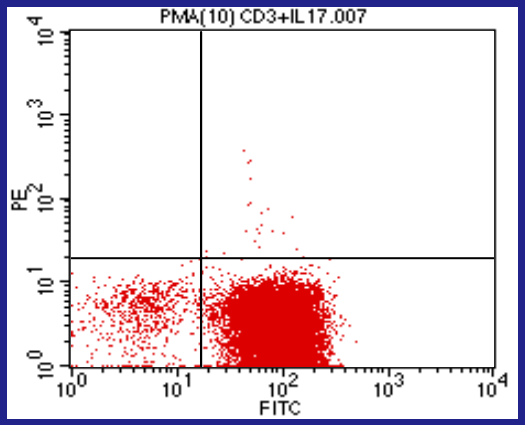
Синдром Ди-Джорджи

Синдром Ди Джорджи

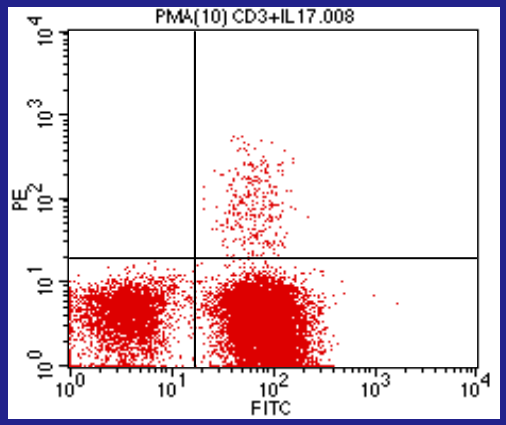
		пол	лим абс	CD3 %	CD19 %	NK %	TREC коп/10^6	KREC коп/10^6
Pt1	1м3н	м	2223	38	29	27	5,09E+01	5,3E+02
Pt2	2,5м	м	1764	9	23	59	отр	отр
Pt3	3м	м	1479	20	29	51	отр	9,8E+03
Pt4	6м	м	5314	28	34	15	отр	1,1E+04
Pt5	3г	м	5122	18	45	37	8,9E+04	3,8E+05
Pt6	4г	ж	3300	30	42	28	отр	6,8E+03
Pt7	5л	ж	4505	55	27	10	отр	1,8E+01
Pt8	3г	м	3675	22	52	20	отр	7,7E+01
Pt9	7л	м	2112	55	25	18	отр	7,7E+02
Pt10	7л	м	1517	47	23	23	отр	отр
Pt11	9л	м	2450	44	16	35	отр	4,9E+03
Pt12	?	м	1386	46	25	19	отр	отр
Pt13	17л	ж	480	69	6	21	3,1E+00	отр
Pt14	12л	ж	1086	80	11	6	3,08E+01	3,5E+03
N			>2400	59-78	16-26	3,5-21	2,3E+03-3,2E+05	1,0E+03 1,0E+05

Синдром Ди Джорджи (аутоиммунные осложнения)

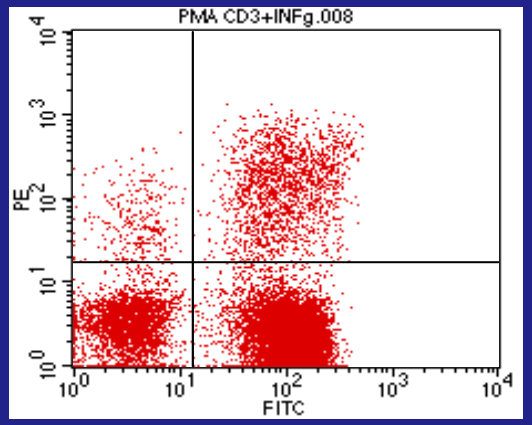
Пациентка 13 IL17=0,1%

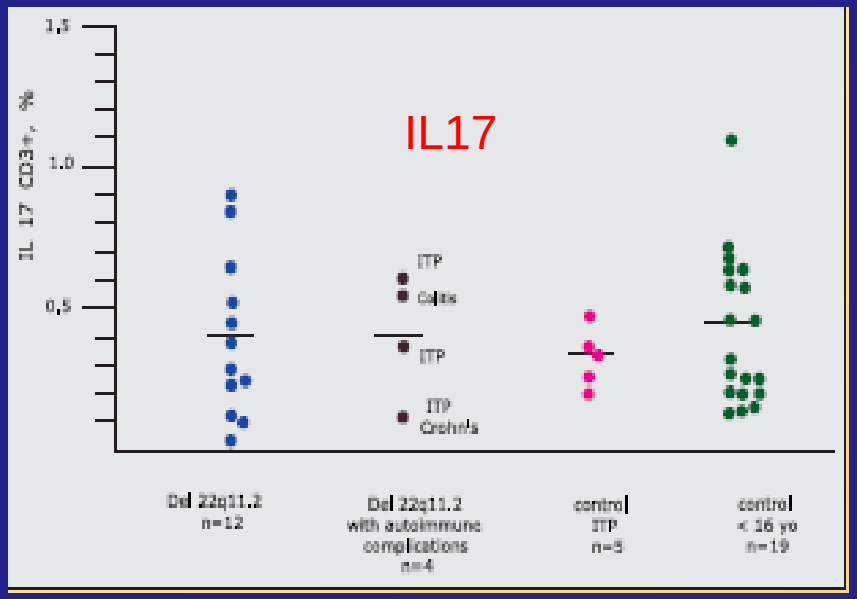


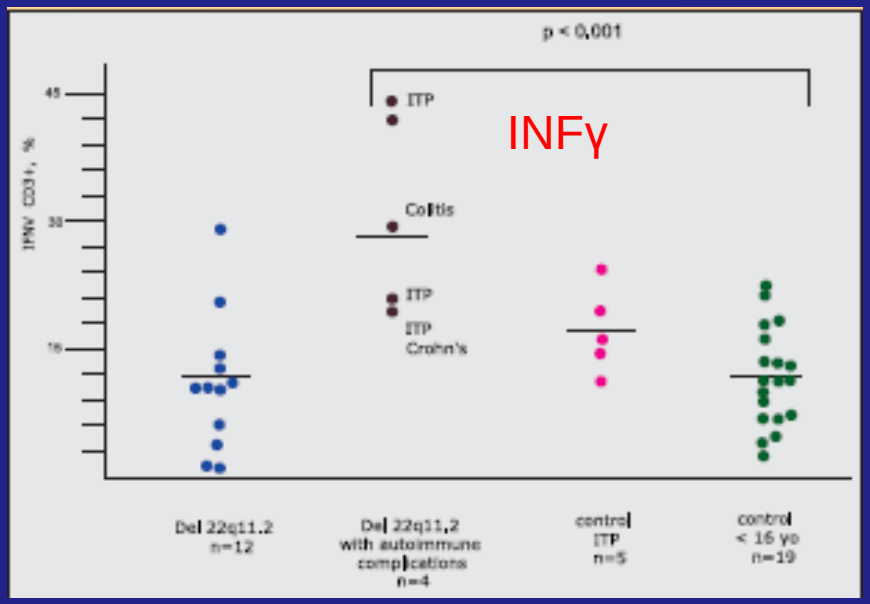
Здоровый контроль IL17=2%



Здоровый контроль INFγ=11%







Две группы пациентов: без аутоиммунных осложнений и с аутоиммунными осложнениями
Две группы контролей: без ПИД, но с идиопатической тромбоцитопенией (ITP) и здоровые.

Дефекты репарации ДНК

- Прогрессивное снижение циркулирующих Т- и В-лимфоцитов, часто снижены IgA, IgE и субклассы IgG, повышены мономеры IgM, снижена вариабельность антител и ответ на антигены.

- Атаксия телеангиэктазия (синдром Луи-Бар)

Мутация в ATM гене

Нарушения клеточного цикла, дефекты репарации ДНК, в том числе в генах Т-клеточного рецептора и генах иммуноглобулинов, хромосомная нестабильность, прогрессирующая церебральная атаксия, телангиэктазия, лимфоретикулярные и др. малигнизации, повышенная чувствительность к радиации, рецидивирующие синуситы и пневмонии

Синдром Ниймеген

Гипоморфная мутация в NBS1 (Nibrin) гене.

Микроцефалия, птичье лицо, повышена частота онкозаболеваний (лимфомы), чувствительность к радиации, хромосомная нестабильность, рецидивирующие ОРВИ, отиты, энтероколиты, хронические бронхиты.

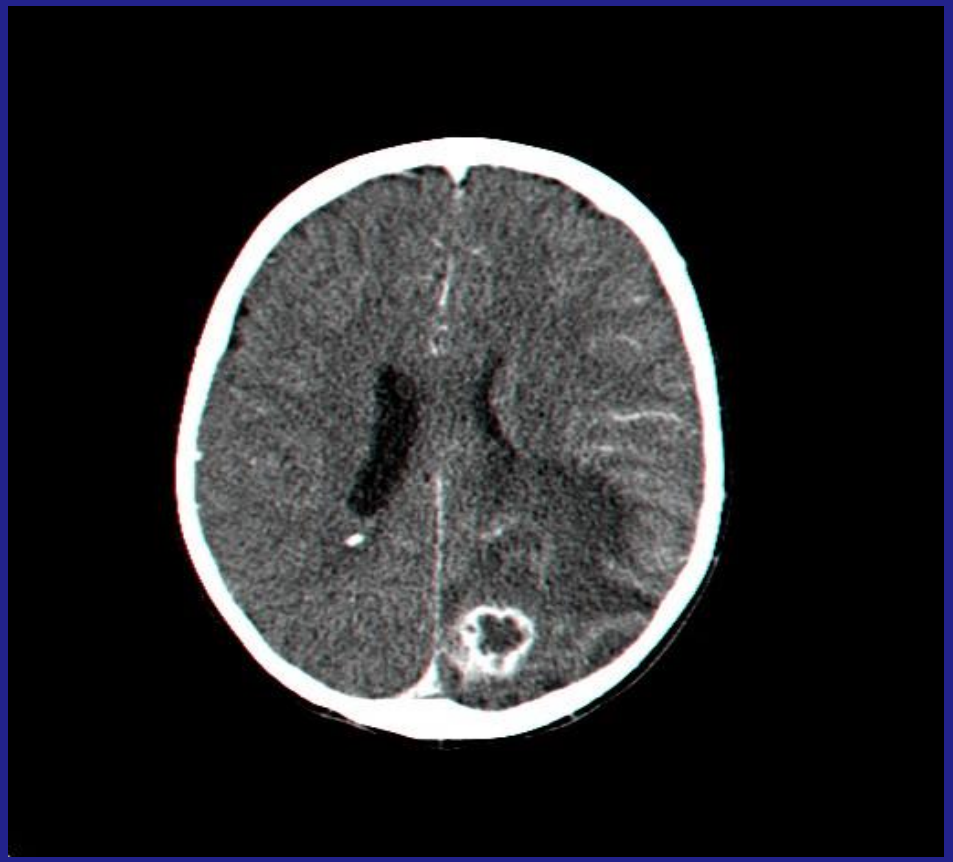
Дефекты репарации ДНК

			пол	Лим абс	CD3 %	CD19 %	NK %	TREC коп/10^6	KREC коп/10^6
Pt1	АТ	8л	ж	924	56	8	30	отр	отр
Pt2	АТ	?	м	3042	59	22	10	1,1E+04	2,8E+04
Pt3	АТ	3г	ж	1600	60	2	23	7,9E+03	отр
Pt4	Н	5л	м	798	36	0,9	50	3,8E+01	отр
Pt5	Н	6л	м	1247	57	3	35	1,2E+03	2,5E+02
N				>2200	64-78	16-25	4-27	2,3E+03 - 3,2E+05	1,0E+03 1,0E+05

Пациент Х. ХГБ

- I бер-ть, 41 нед,3600г,54 см
- Привит по календарю, рос и развивался по возрасту
- С 6 мес.- рецидивирующий парапроктит
- До 4 лет – нетяжелые ОРЗ до 6 раз в год, отиты-дважды
- В 4 года – тяжелая затяжная пневмония
- 4г3мес. – абсцесс печени
- 5л10мес - фурункулез с регионарным лимфаденитом
- 7лет - гнойный лимфаденит, гранулема правого легкого

Пациент Х. ХГБ



Больной с ХГБ 7 лет

- 2 г – левосторонняя деструктивная пневмония, фебриноторакс
- 3 г – левосторонняя нижнедолевая полисегментарная пневмония (рентгенологическая находка)
- 4 г – фурункул левого бедра +двухсторонняя полисегментарная пневмония

(начало формирования деформации грудной клетки)

- 6 лет – холодный абсцесс передней брюшной стенки + инфильтративные очаги в обоих легких
- RF – 64 (N до 25)

ХГБ: бочкообразная грудная клетка и «барабанные» палочки

Отделение иммунопатологии - ТКИН

Т-лимфопения, агранулоцитоз, сепсис, грибковый дерматит и мукозит, БЦЖ-ит локальный

Терапия: по абсолютным жизненным показаниям: постоянная интенсивная а/б и противогрибковая (орунгал + флуконазол), противотуберкулезная 3-терапия, КСФ (граноцит 15 мкг/кг), сопроводительная, местная

ТКМ

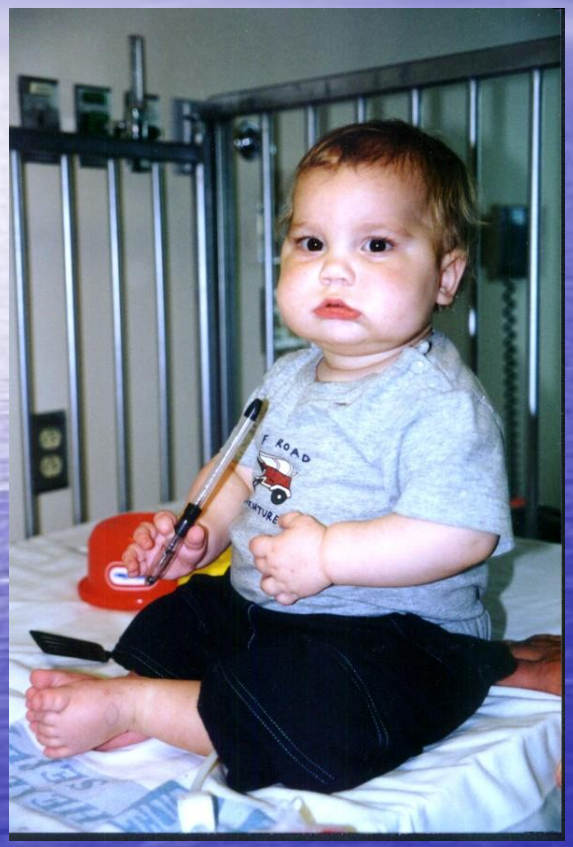
ТКИН – клинические примеры

Больной С.К., 7 мес.
(кахексия, отставание в развитии, кандидоз кожи)

Больной С.К., 7 мес.
(диарея, метаболические нарушения)

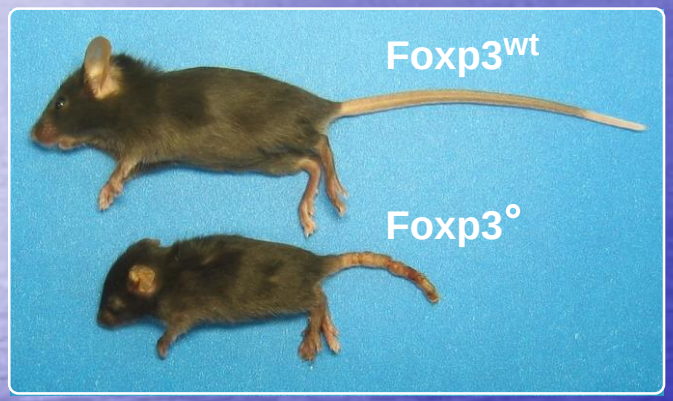
ТКИН – клин. примеры: БЦЖит

IPEX – клиническая презентация

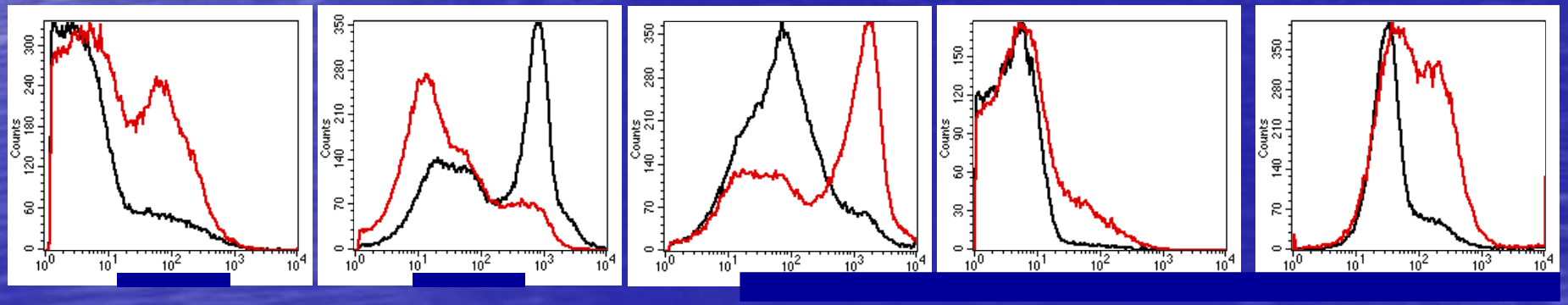


- **Впервые описан в 1982 Powell et al. Как синдром сопровождающийся диареей, полиэндокринопатией и летальными инфекциями в раннем возрасте.**
- **Манифестайия диабета в неонатальном периоде**
- **Гипотериоидизм**
- **Энтериты**
- **Гемолитическая анемия и тромбоцитопения.**
- **Дерматиты (экзема)**
- **Смерть в возрасте 1-2 лет**

Foxp3° Mice Succumb to an Aggressive Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome

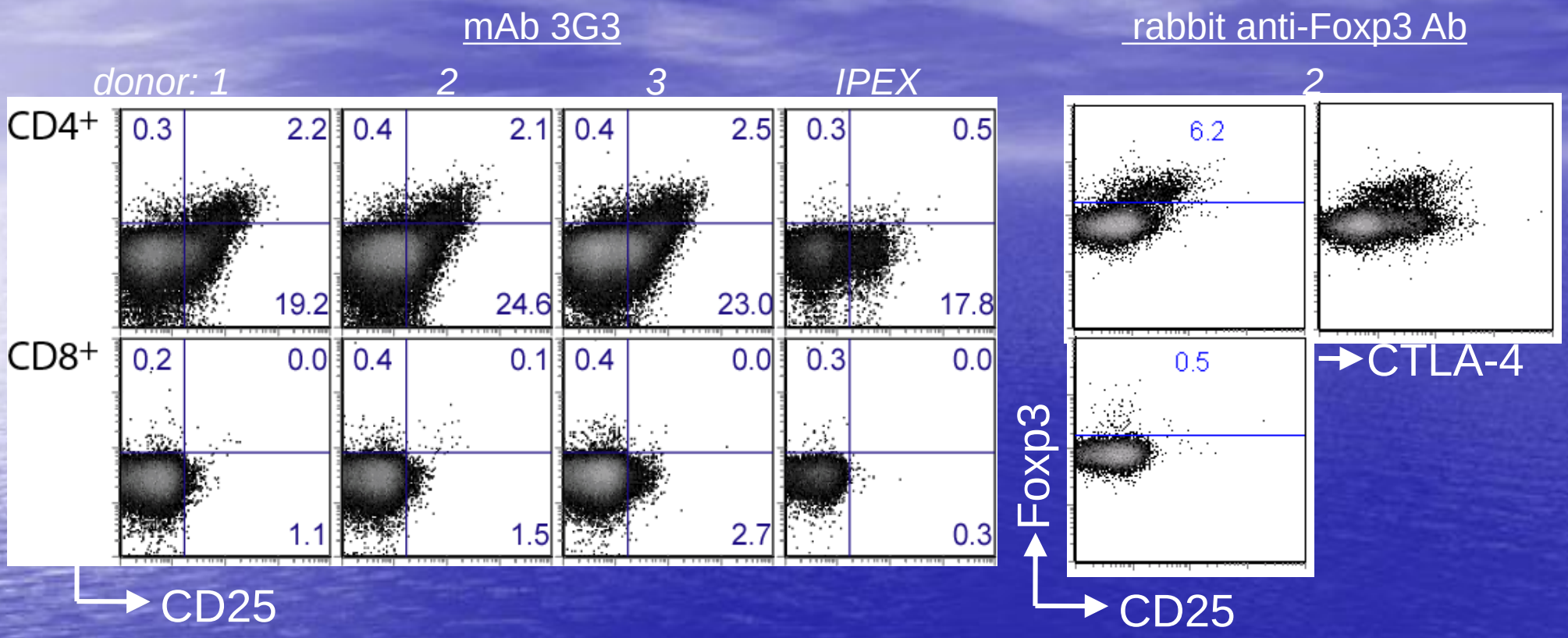


CD4+ T cells



Foxp3wt Foxp3°

Foxp3 expression in human PBMC



- 5-6% of CD4+ T cells in PBMC.
- all $CD25^{high}$ CD4+ cells.
- a small subset of $CD4^{+}CD25^{-}$ and $CD4^{+}CD25^{low}$ cells.
- not detected above background among $CD8^{+}$ T cells.

Синдром Вискотта-Олдрича (СВО)

В основе лежит мутация гена, который кодирует белок (WASP), отвечающий за полимеризацию актина и формирование цитоскелета.

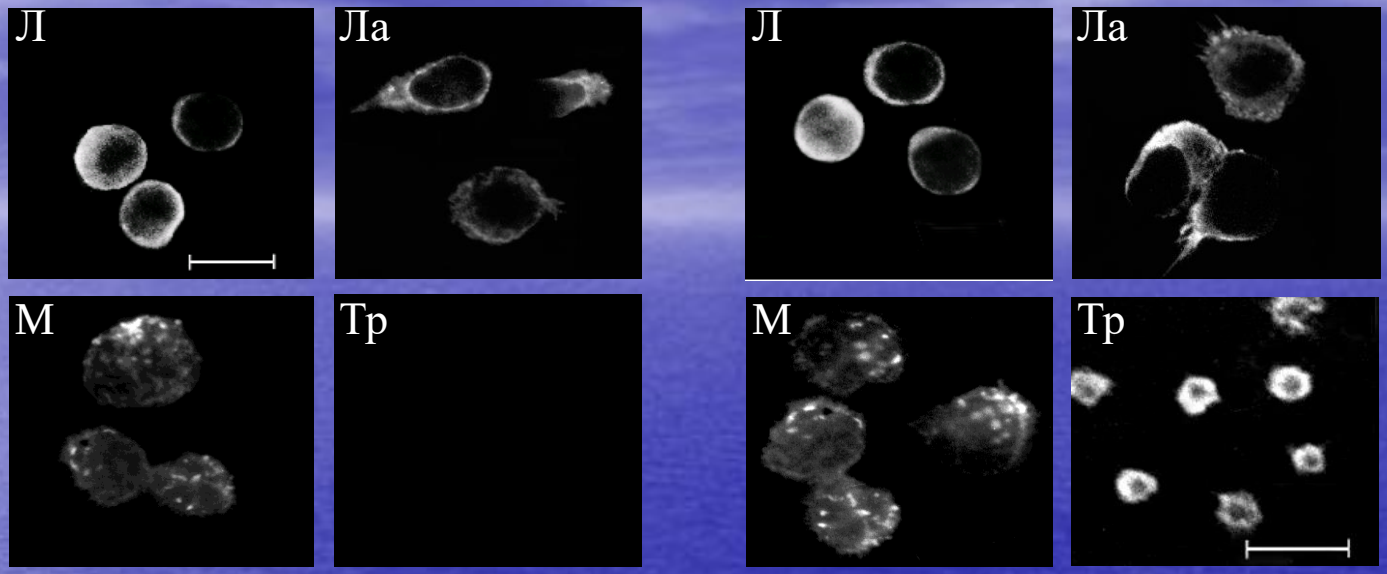
Отсутствие белка WASP в лимфоцитах→нарушения функций Т-клеток и регуляции синтеза антител

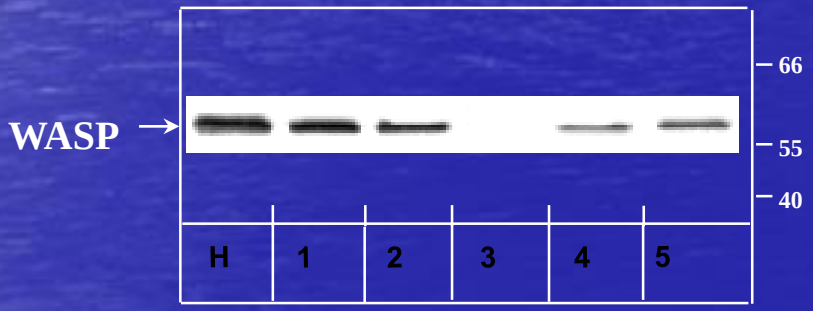
WASP

- Молекулярный дефект при WAS заключается в отсутствии белка WASP
- белок WASP кодируется геном WASP, локализованном на коротком плече Х-хромосомы (Xp.11.22)
- WASP играет критическую роль в полимеризации актина и формировании цитоскелета

СВО

Норма





Клиническая картина СВО

Классическая триада

- Геморрагический синдром (обусловленный тромбоцитопатией)
- Высокая частота тяжелых инфекционных заболеваний
- Экзема (81 %)

Аутоиммунные проявления СВО

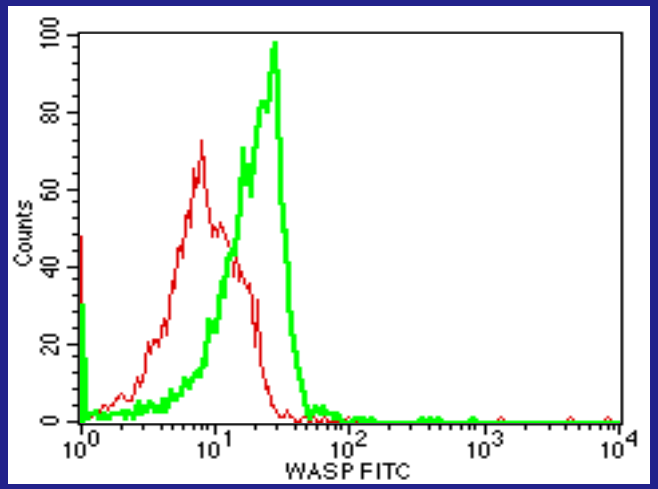
Развиваются у ≈ 40 % больных

- Аутоиммунная цитопения (анемия, тромбоцитопения, нейтропения)
- Васкулит
- Артрит
- НЯК
- Гломерулонефрит
- Миозит и дерматомиозит
- Узловатая эритема
- Увеит
- Аутоиммунный гепатит

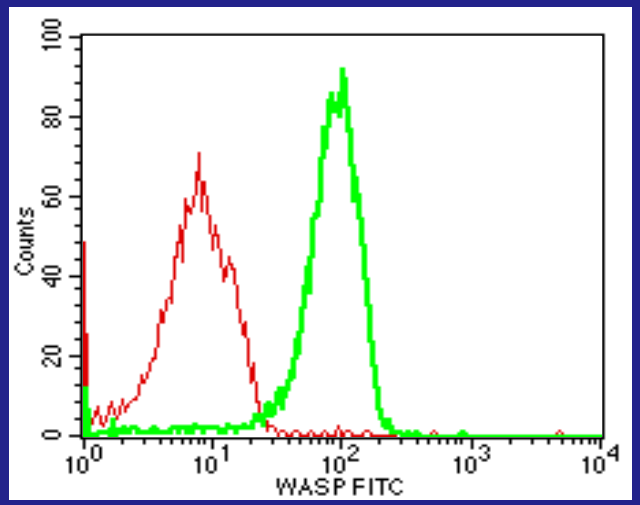
Больной с СВО 4-х лет

- С 3 месяцев до 3-х лет тяжелый распространенный атопический дерматит
- В 1,5 лет – аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура, тяжелый криз
- В стадии ремиссии PLT 17-80 т
- В 3 года спленомегалия, спленэктомия
- В 3 г 9 мес – аутоиммунная гемолитическая анемия, тяжелый криз

Синдром Вискотта-Олдрича



Пациент, муж, 10лет



Здоровый контроль

Диагностические критерии

Пациенты мужского пола с врожденной тромбоцитопенией (менее 70000 тромбоцитов /мкл), с мелкими тромбоцитами и одним из следующих признаков:

1. *Х-сцепленные мутации в гене WASP.*
2. *Отсутствие WASP mRNA или белка в лимфоцитах.*
3. *У родственников мужского пола по материнской линии мелкие тромбоциты и тромбоцитопения.*

Снижен уровень IgM, часто повышены IgA и IgE

Прогрессивное снижение циркулирующих Т-лимфоцитов, нормальный уровень В-лимфоцитов

Нарушено строение цитоскелета в Т-лимфоцитах и тромбоцитах.

Экземы, лимфомы, аутоиммунные заболевания, включающие тяжелые васкулиты и гломерулонефриты, IgA нефропатии, бактериальные и вирусные инфекции.

АЛГОРИТМ ОБСЛЕДОВАНИЯ ДЕТЕЙ С РЕЦИДИВИРУЮЩИМИ ИНФЕКЦИЯМИ

ГЭР - гастро-эзофагальный рефлюкс; ПИД - первичный иммунодефициты

Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Щербина А.Ю., Продеус А.П., Румянцев А.Г. Часто болеющие дети: чем они больны на самом деле? //Трудный пациент, 2007. Т. 5. № 2. С. 25-27

Лабораторная диагностика ПИД

Общеклинические исследования

(анализ крови, биохимия)

Скрининг новорожденных

(ТРЕК, КРЕК и др.)

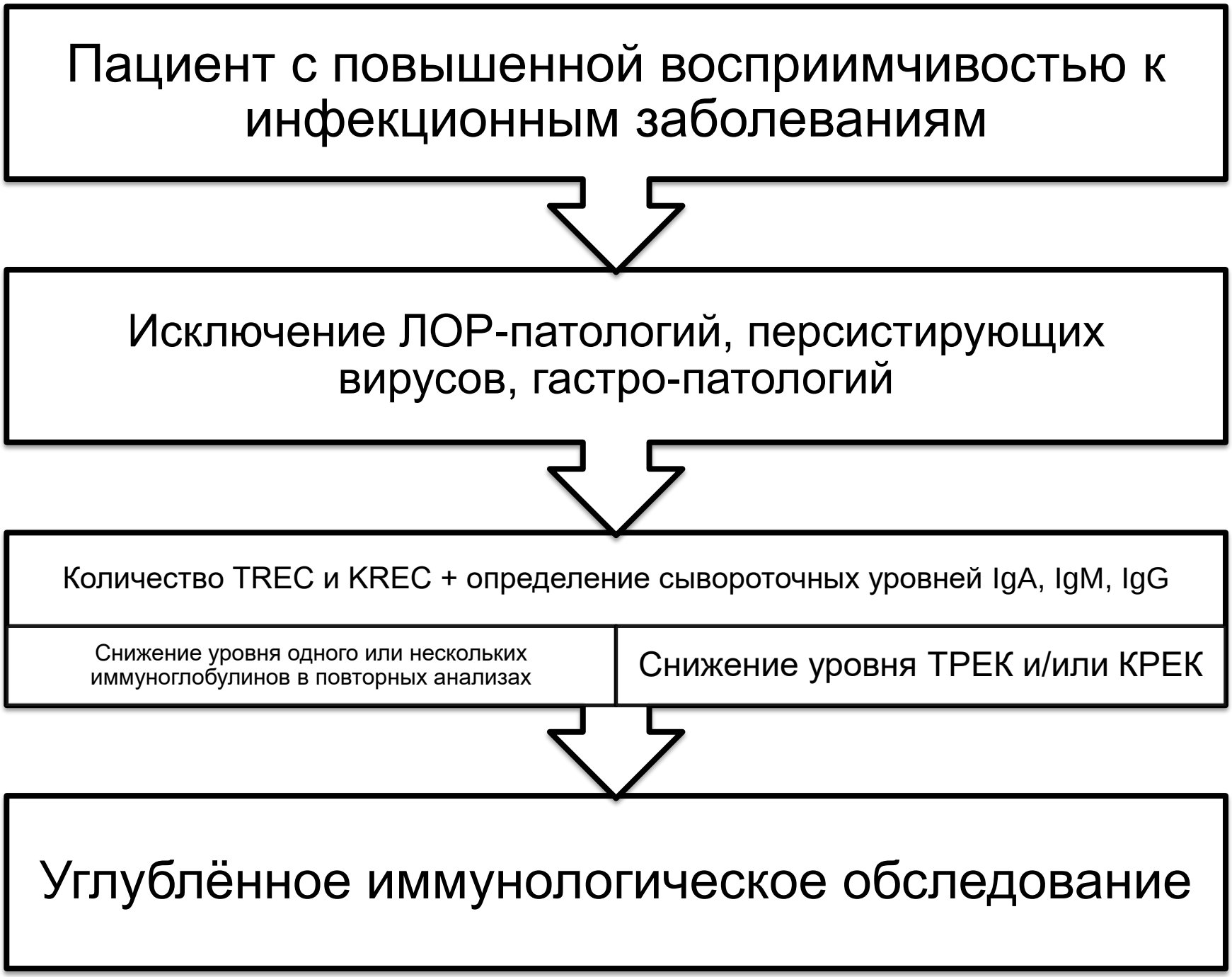
Иммунофенотипирование

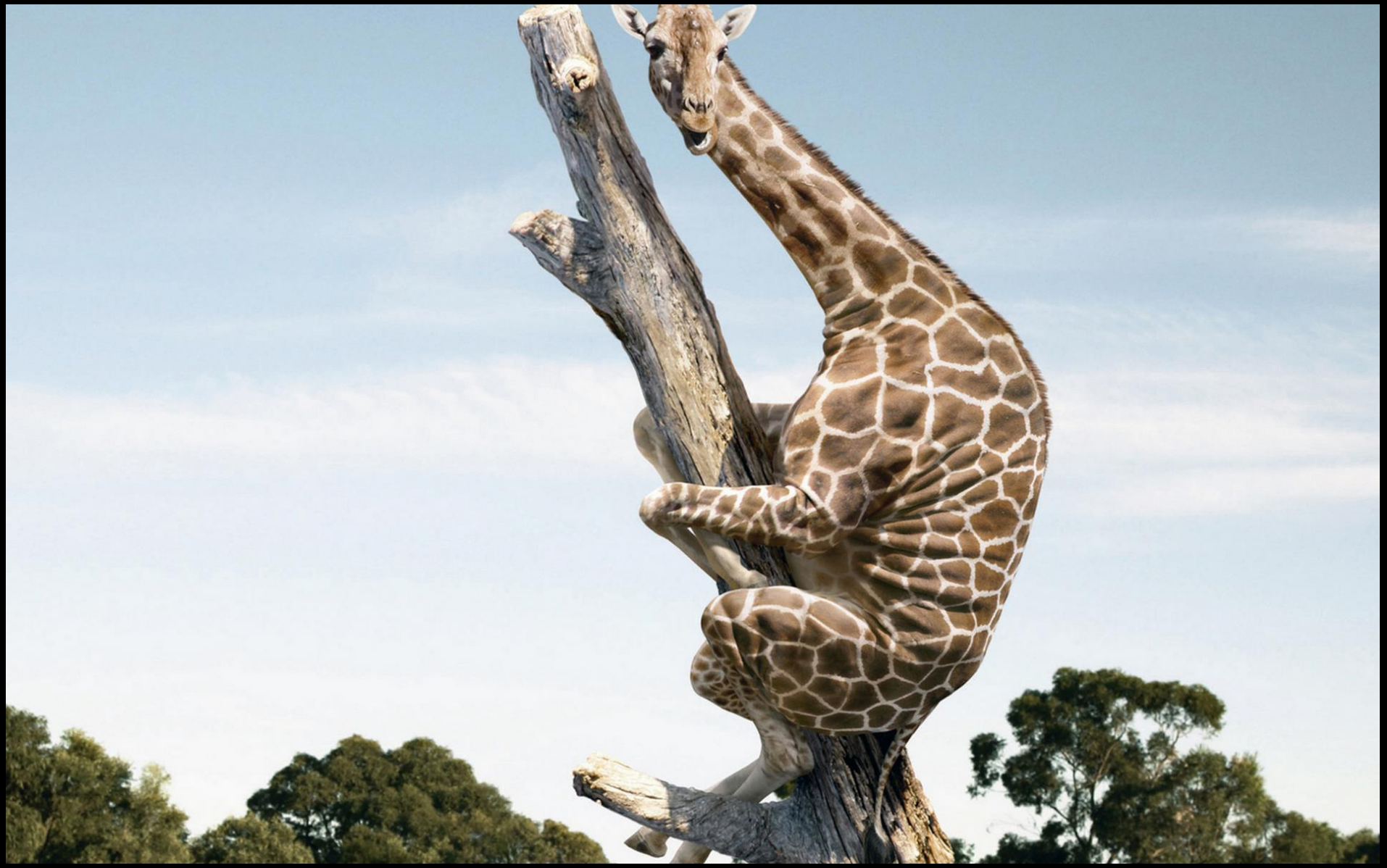
Гуморальный иммунитет (иммуноглобулины, система комплемента, поствакцинальный ответ)

Фунциональные тесты

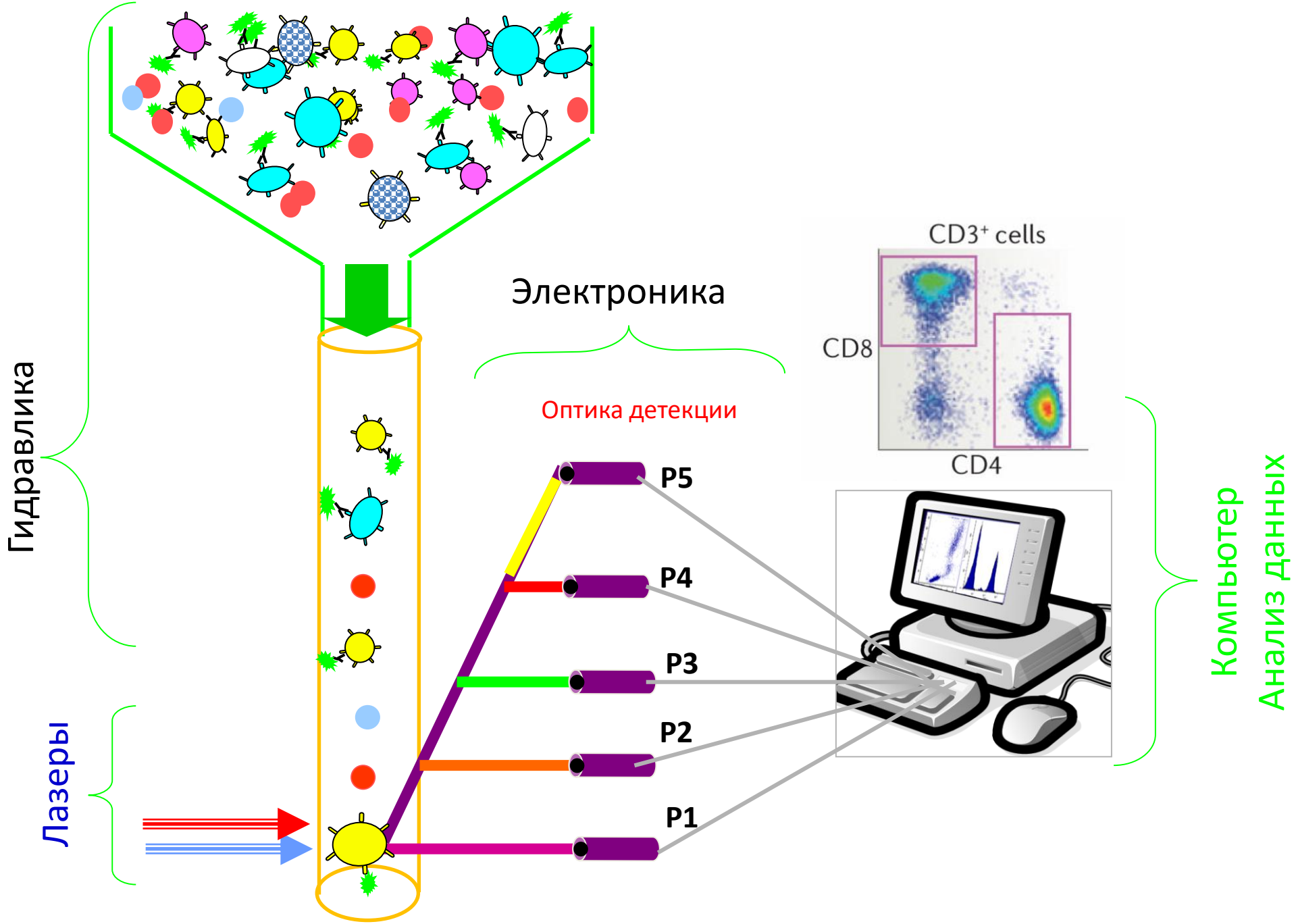
(митогенная стимуляция, фагоцитоз, цитотоксичность, миграция и др.)

Молекулярно-генетические исследования


Пациент с повышенной восприимчивостью к инфекционным заболеваниям
Исключение ЛОР-патологий, персистирующих вирусов, гастро-патологий
Количество TREC и KREC + определение сывороточных уровней IgA, IgM, IgG
Снижение уровня одного или нескольких иммуноглобулинов в повторных анализах
Снижение уровня ТРЕК и/или КРЕК
Углублённое иммунологическое обследование



Лазерная проточная цитометрия



Применение проточной цитометрии в диагностике ПИД

CD3+, CD19+, CD3-(16+56)+, CD4+CD45RA+, CD4+CD45RO+, CD19+CD27+ и т.д.

CD40L, IL7Ra, MHC I,II, IFNgR1 (MSMD), CD18 (LAD type I) CD15s (LAD type II), CTLA4, IL12Rb1

Бурст-тест, фаготест, CD107a (FLH), pSTAT1, pSTAT4, pSTAT3, пролифера-ция CFSE

WASp, BTK, FOXP3 (IPEX), DOCK8, SAP, XIAP, перфорин (FLH)

Цитометрические тесты в лаборатории иммунологии ДГКБ №9 им. Г.Н. Сперанского

Фенотипирование лимфоцитов

- *Скрининг:* CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD(16+56)+, CD3+CD(16+56)+

Т-лимфоциты: CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3+CD4+CD45RA+CD45RO-, CD3+CD4+CD45RA-CD45RO+, CD3+CD4+CD45RA+CD45RO+, CD3+CD4+CD25+CD127^{low}, CD3+TcR αβ+, CD3+TcR γδ+

В-лимфоциты: CD19+CD5+, CD19+CD27+IgD+, CD19+CD27+IgD-, CD19+CD27-IgD+, CD19+CD21^{low}, CD19+CD38+++IgM+++, CD19+CD38+++IgM^{low}, CD19+CD21^{low}CD38^{low}

ЕКК: CD3-CD(16+56)+, CD3-CD16+56+, CD3-CD56+CD57+

Активационные маркеры:

CD3+HLA DR+, CD3+CD25+, CD3+CD8+CD38+

Фунциональные тесты:

ФГА стимулированный CD69, CD40L,

ИЛ-6 стимулированный STAT3,

ФМА стимулированные IL17, INFγ, TNFα

Активность фагоцитов:

поглощение меченых бактерий, Бурст-тест

Специфические маркеры: WASp, CD40L

реагенты

Наименова-ние	Клон	Производитель	Наиме-нование	Клон	Произво-дитель	Наименование	Клон	Произво-дитель
CD45RA	IM1834U	BC	IgM	17-9998	eBioscience	IL17A	12-7178	eBioscience
CD45 RO	IM2712U	BC	IgD	11-9868	eBioscience	INFg	IM2717U	BC
CD127	A64617	BC	CD27	12-0279	eBioscience	TNFa	IM3270U	BC
TCR ab	A39499	BC	CD21	IM0473U	BC	CD69	IM1943U	BC
TCR gd	IM1418U	BC	CD38	A07779	BC	CD3	A07749	BC
CD3CD25	IM2667U	BC	CD5	A07753	BC	CD3/CD19/CD45	TC643	Dako
CD3 HLA DR	A07738	BC	CD40L	IM2216U	BC	CD3/CD8/CD4	TC641	Dako

EuroFlow algorithm for diagnosis and classification of PID of the lymphoid system (8- or 10-colors)

EuroFlow

Suspicion of (S)CID
- Children < 1 year
- Severe recurrent infections with unusual pathogens
- Failure to thrive

General suspicion of PID
- Recurrent and/or unusual infections
- Recurrent infections with same pathogen
- Auto-immunity, inflammation and/or lymphoproliferation

Suspicion of PAD
- Recurrent respiratory infections
- Low serum Ig levels
- Poor response to vaccination

PID screening tube
+ B-, T- and NK-cell counts

SCID/RTE tube

Combined in 10-colors

T-cell subset tube

Normal

Other

T-cell problem

virtually no T- (+ B-) cells

T-cell (subset) count ⬇*

B-cell problem

B-cell (subset) count ⬇*

Strongly reduced B-cells

Pre-GC + Post-GC B-cell tube(s)

memory B-cells present

Ig-Isotype tube(s)

Precursor-B-cell tube
(bone marrow analysis)

Specific analyses for ALPS, XLP, and other diseases

T- SCID

T- /B- SCID

CD8 T-cell deficiency

CD4 T-cell deficiency

Other T-cell defects

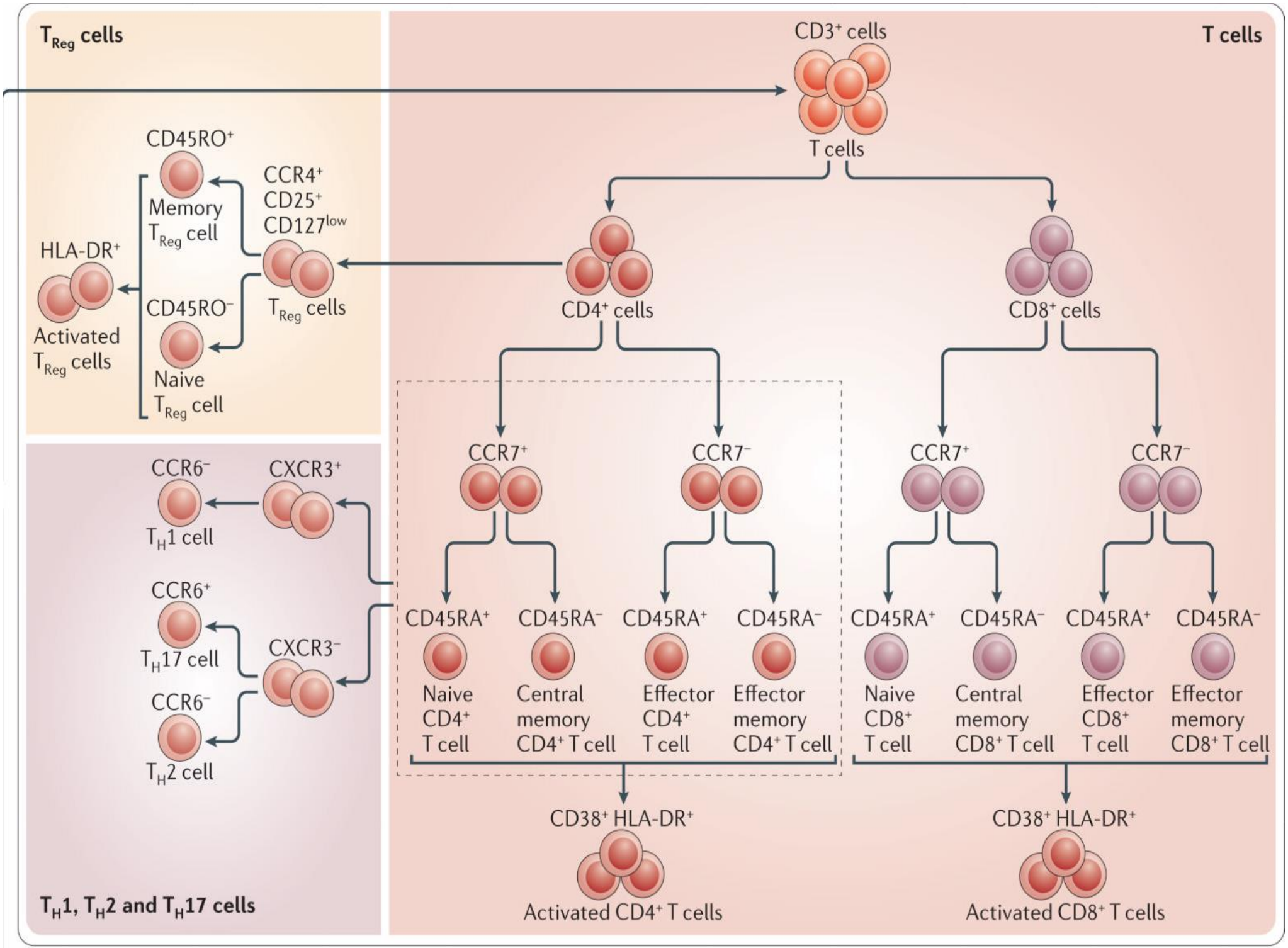
Ig isotype deficiencies

Agammaglobulinemia

Hyper IgM syndrome

CD19 complex deficiency

Various types of CVID



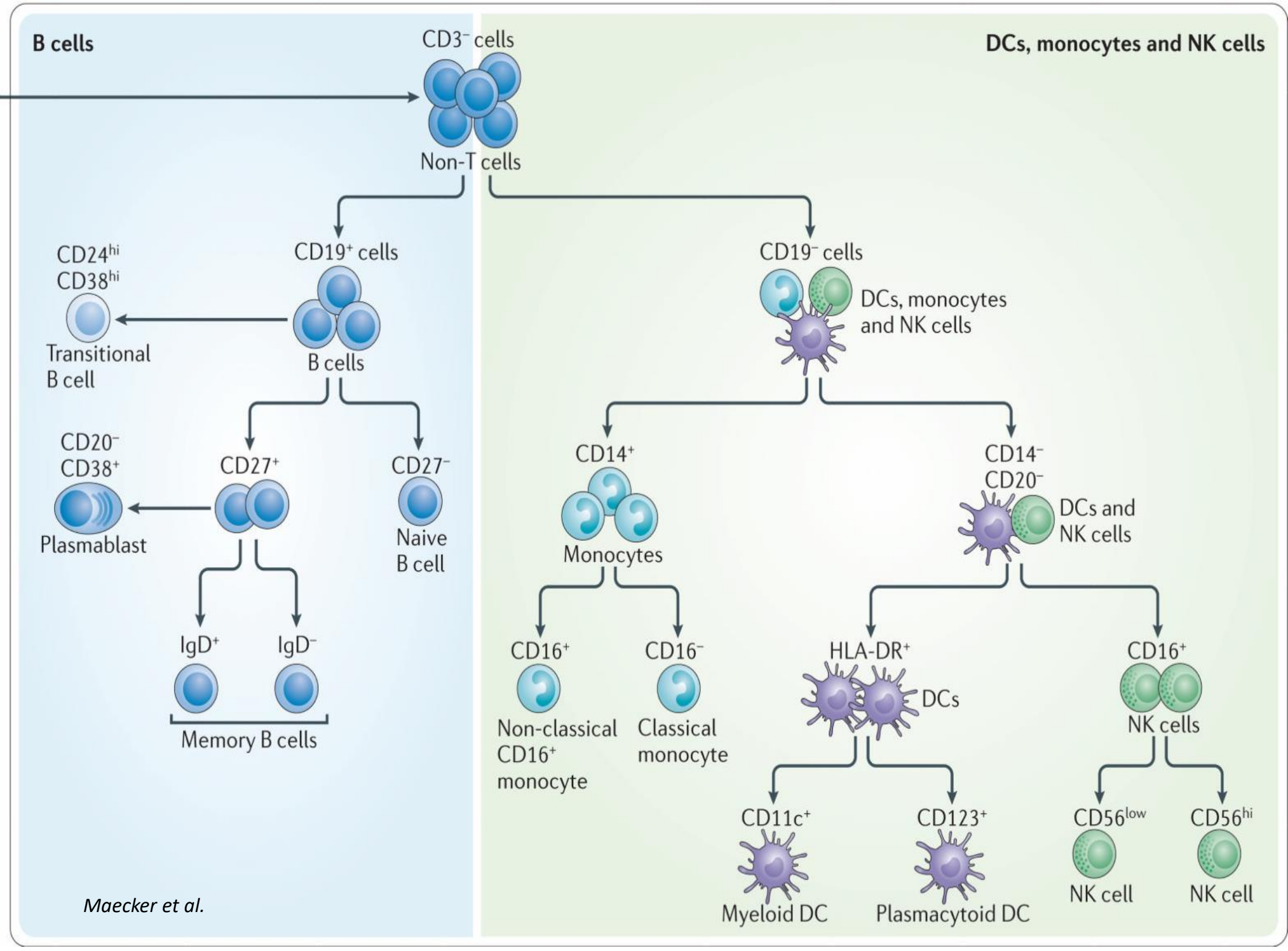
Maecker et al.

Иммунофенотипирование

- **CD3** = **Т-лимфоциты**
- **CD3/CD4** = **Т-хелперы**
- **CD3/CD8** = **Т-цитотоксические**
- **CD4/CD25+/CD127^{low}(Foxp3+)** = **Т-регуляторные**
- **CD3/CD4/CD45RA+/CD62L+(CD31+)** = **Наивные Т-хелперы**
- **CD3/CD4/CD45RO** = **Т-хелперы памяти**

- **CD3/CD4/CD45RA-/CD197+(CD62L+)** = **Т-хелперы центральные памяти**
- **CD3/CD4/CD45RA-/CD197-(CD62L$^{int/low}$)** = **Т-хелперы эффекторные памяти**
- **CD3/CD4/CD45RA+/CD197-(CD62L$^{low/-}$)** = **Т-хелперы эффекторные**

- **CD3/CD4/CD45RA+/CD197+(CD62L+)** = **Наивные Т-цитотоксические**
- **CD3/CD4/CD45RA-/CD197+(CD62L+)** = **Т-цитотокс. центральные памяти**
- **CD3/CD4/CD45RA-/CD197-(CD62L$^{int/low}$)** = **Т-цитотокс. эффекторные памяти**
- **CD3/CD4/CD45RA+/CD197-(CD62L$^{low/-}$)** = **Т-цитотокс. эффекторные**

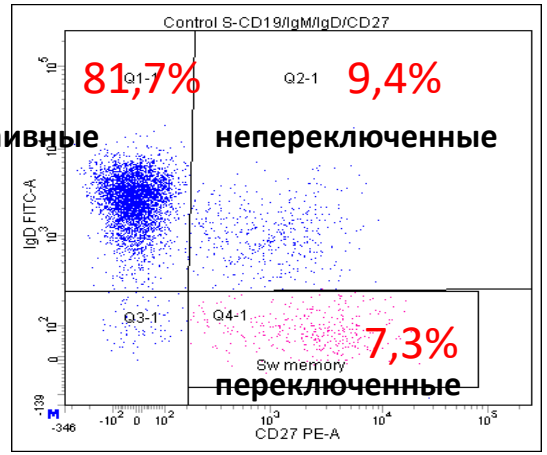

B cells
DCs, monocytes and NK cells
CD3⁻ cells
Non-T cells
CD19⁺ cells
CD19⁻ cells
CD24hi CD38hi
Transitional B cell
B cells
DCs, monocytes and NK cells
CD20⁻ CD38⁺
Plasmablast
CD27⁺
CD27⁻
Naive B cell
CD14⁺
Monocytes
CD14⁻ CD20⁻
DCs and NK cells
IgD⁺
IgD⁻
Memory B cells
CD16⁺
CD16⁻
Non-classical CD16⁺ monocyte
Classical monocyte
HLA-DR⁺
DCs
CD16⁺
NK cells
CD11c⁺
CD123⁺
CD56low
CD56hi
Myeloid DC
Plasmacytoid DC
NK cell
NK cell
Maecker et al.

Иммунофенотипирование

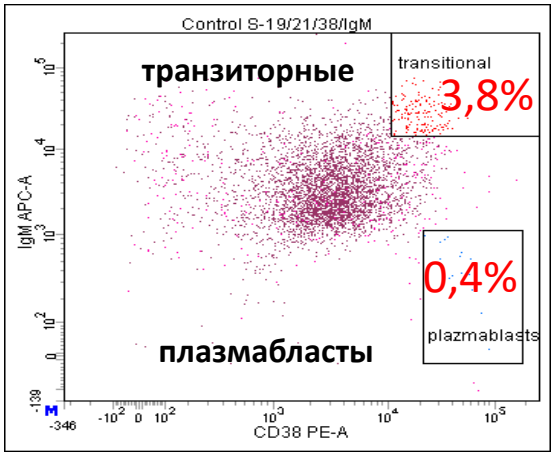
- **CD19** **= В-клетки**
- **CD19/CD38^{hi}/IgM^{hi}** **= Транзиторные В-клетки**
- **CD19/IgM+/IgD+/CD27-** **= Наивные В-клетки**
- **CD19/CD27+** **= В-клетки памяти**
- **CD19/IgM++/IgD+/CD27+/CD21+** **= Непереключенные В-кл. памяти**
- **CD19/IgM-/IgD-/CD27+/CD21+** **= Переключенные В-кл. памяти**
- **CD19/CD38^{hi}/IgM$^{low/-}$** **= Плазмабласты**
- **CD19/CD38^{hi}/CD24^{low} (CD27+CD138+)** **=Плазматические клетки**
- **CD19/CD21^{low}/CD38^{low}** **= Активированные В-клетки**
- **CD19/CD5+** **= В1-клетки**
- **CD19/CD38^{hi}/CD24^{hi}/IL-10^{hi}** **= Регуляторные В-клетки**

ПИД. В-лимфоциты

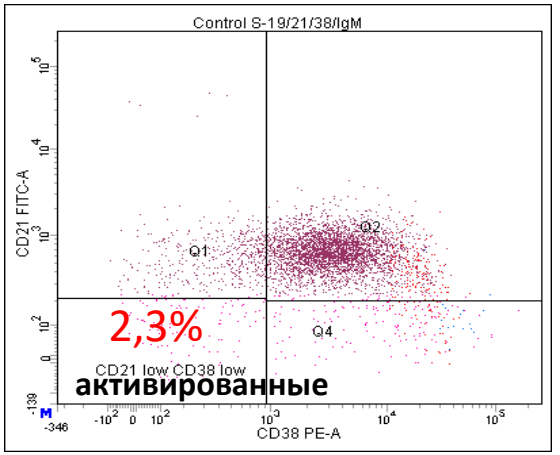
Наивные/памяти



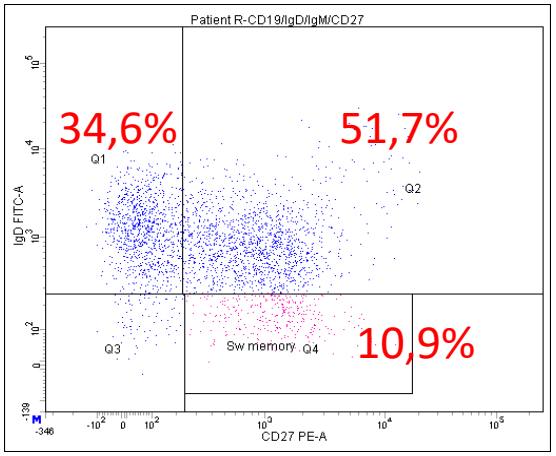
Транзиторные/плазмабласты

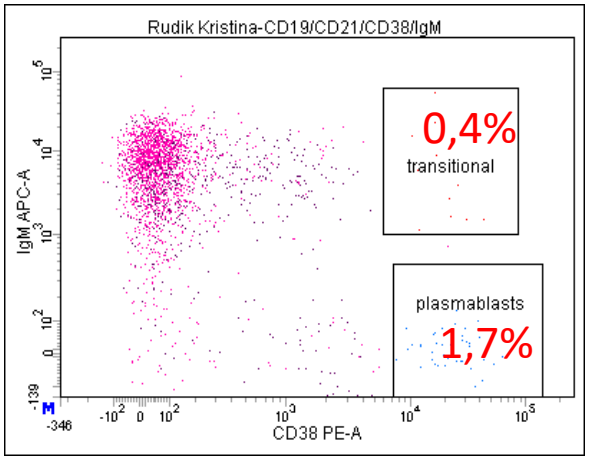


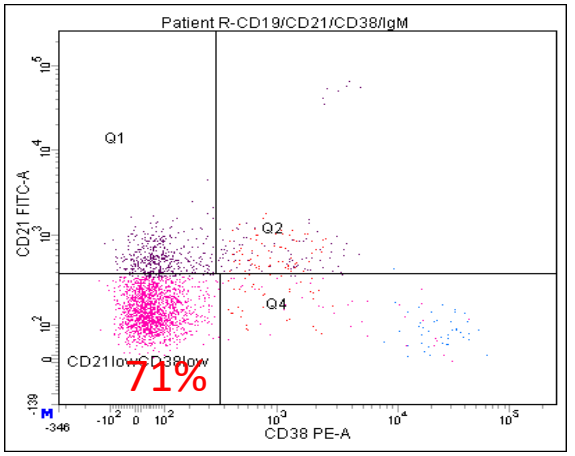
Активированные CD21low CD38low



Пациентка без иммунодефицита, 7 лет



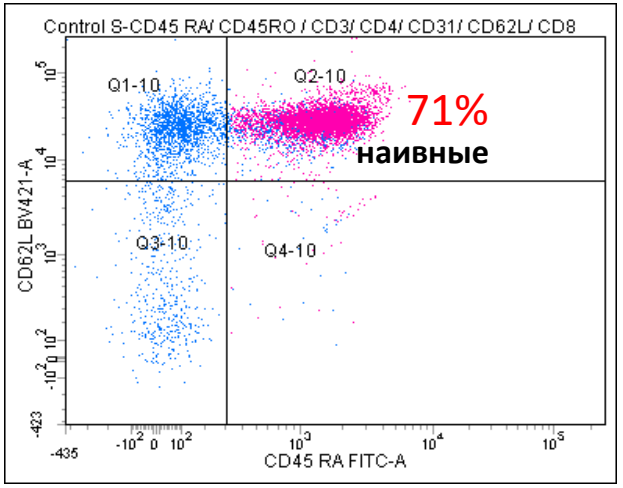




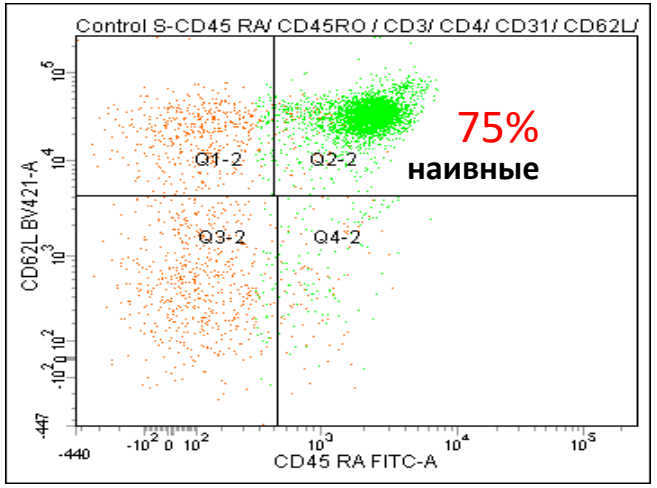
*Пациентка с ПИД (**синдромом Ниймеген**, мутация 657del15 в гене NBS1), 7 лет, хронический бронхит, пневмония, неполный нефротический синдром, тубоотит.*

ПИД. Т-лимфоциты

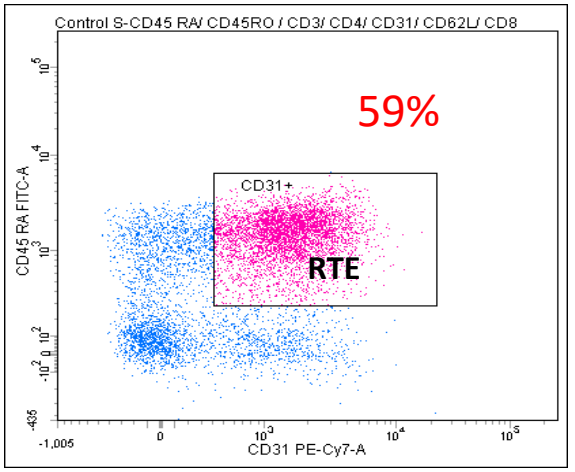
Т-хелперы наивные/памяти



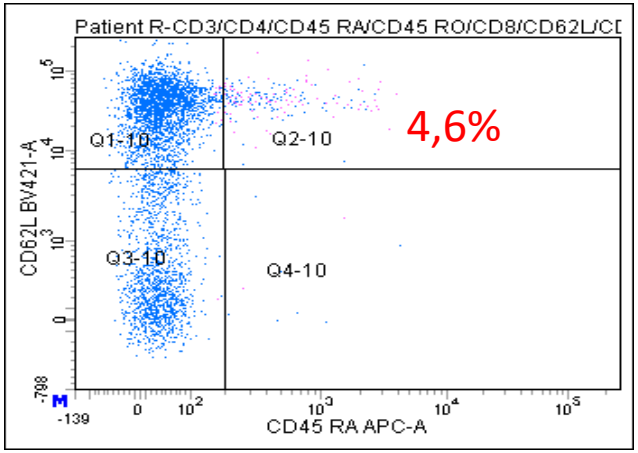
Т-цитотокс. наивные/памяти

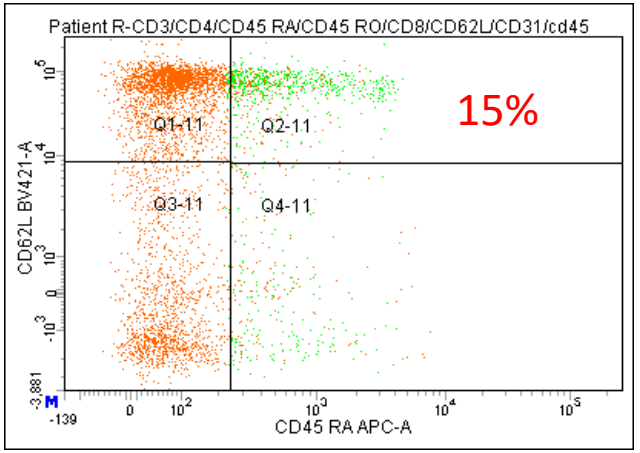


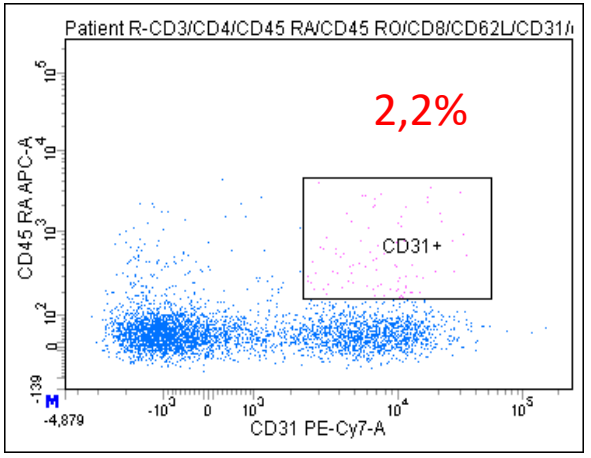
Т-хелперы ранние тимические эммигранты



Пациентка без иммунодефицита

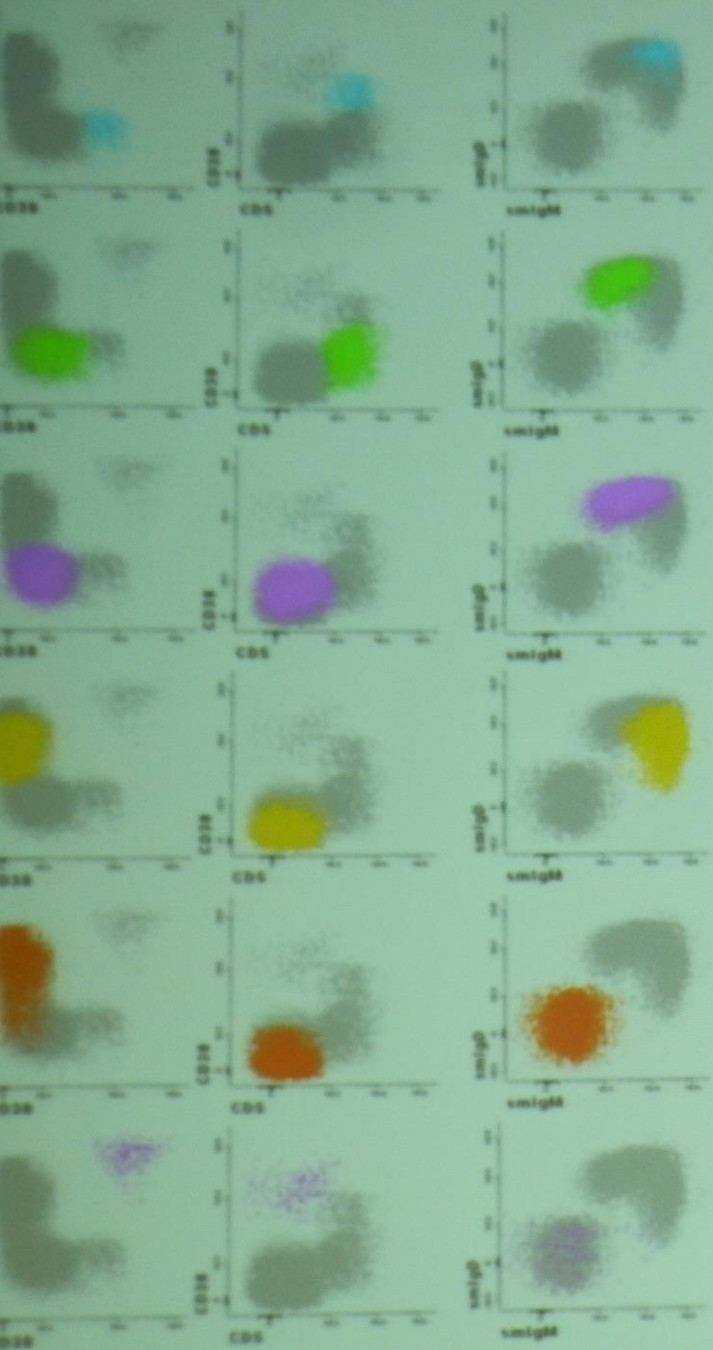


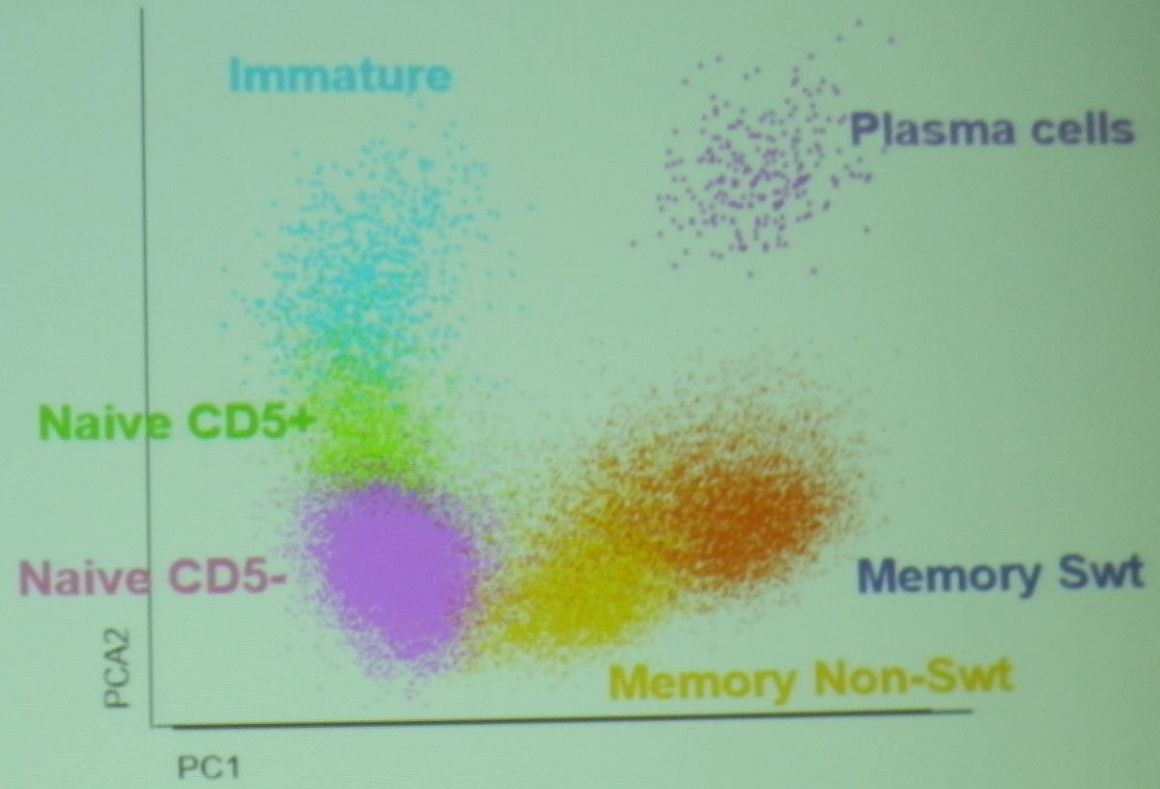




Пациентка с синдромом Ниймеген

Identification of blood B-cell subsets in APS view





EuroFlow

esponsible scientists: Mirjam van der Burg & Martin Perez

Молекулярно-генетическая диагностика ПИД

- **Полногеномное секвенирование (WGS).** (Сборка генома de novo)
- Таргетное ре-секвенирование:

  Полноэкзомное (WES)

  Таргетные панели генов
- RNA секвенирование (профили экспрессии)
- Chip-секвенирование (протеин-ДНК связывание, модификации гистонов, нуклеосомы)
- Традиционное секвенирование по Сэнгеру (“золотой стандарт”)

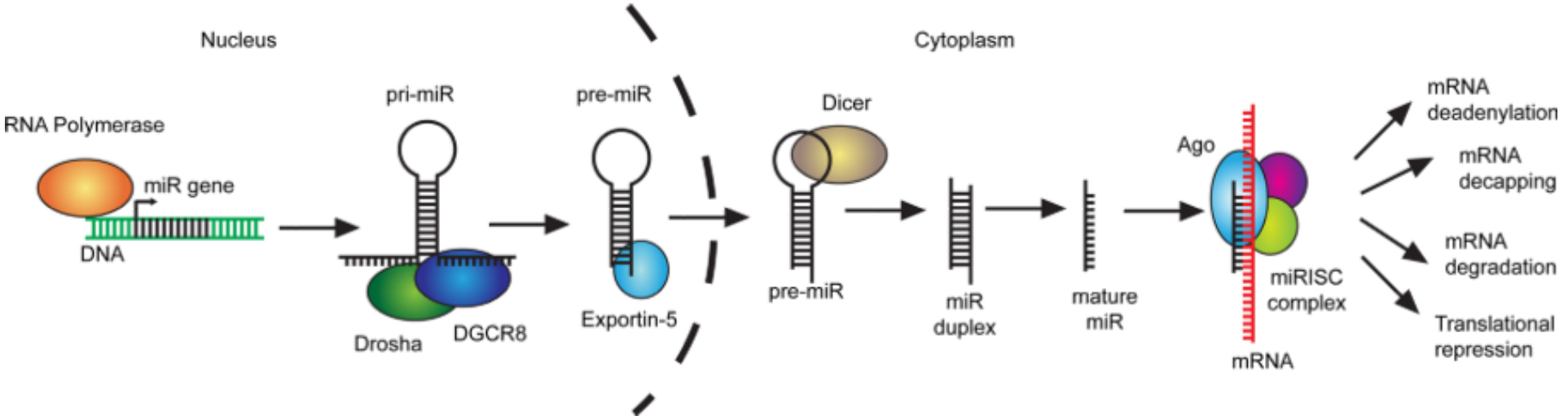
Таргетные панели

82 гена кандидата

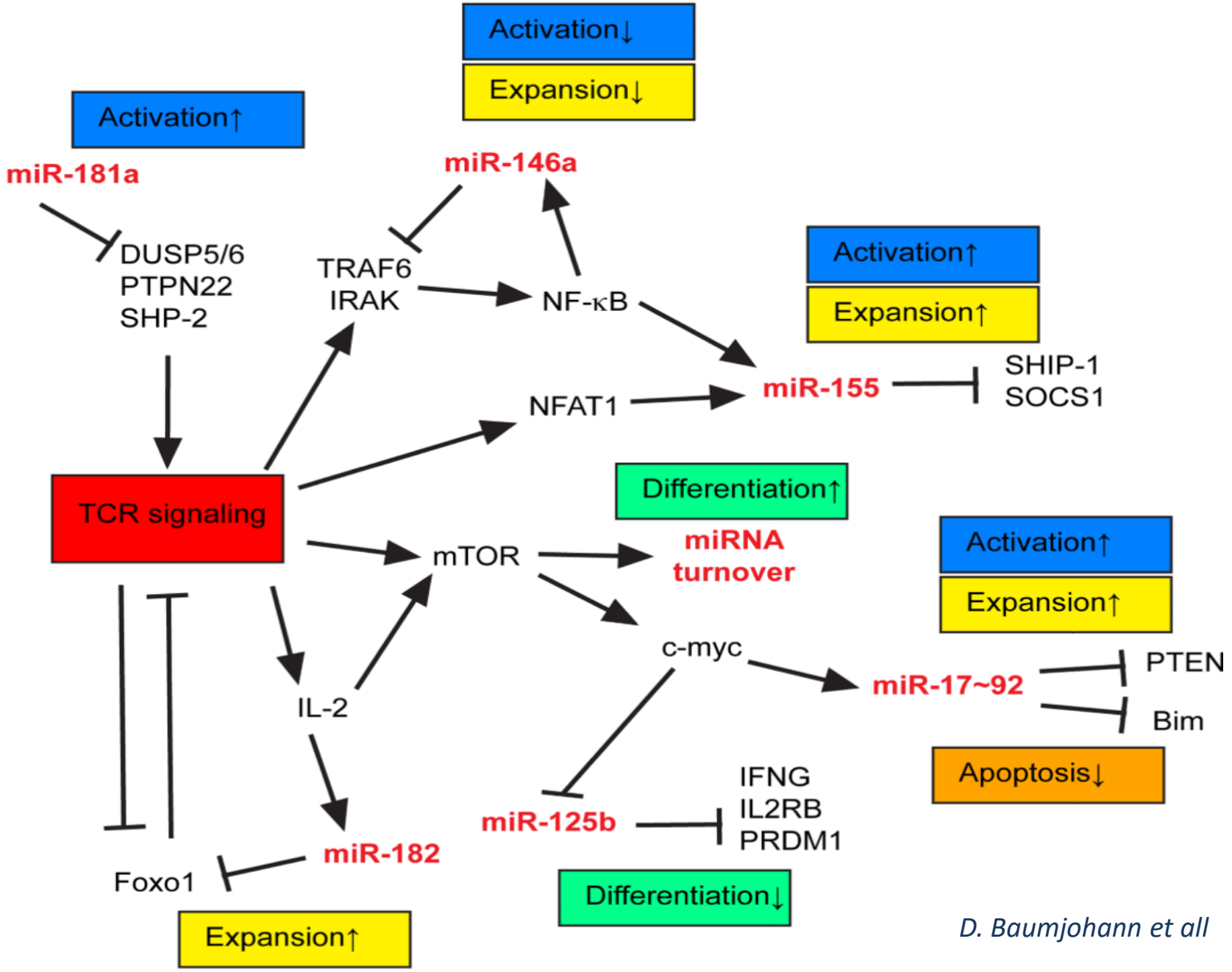
ADA, ADAM17, AICDA, AIRE, BTK, CASP10, CASP8, CD247, CD27, CD3D, CD3E, CD3G, CD40, CD40LG, CIITA, CORO1A, CYBA, CYBB, DCLRE1C, DOCK8, EPCAM, FAS, FASLG, FOXP3, GUCY2C, HPS1, HPS4, HPS6, ICOS, IKBKG, IL10, IL10RA, IL10RB, IL2RG, IL7R, ITGB2, ITK, JAK3, LIG4, LRBA, LYST, MAGT1, MYO5B, NCF1, NCF2, NCF4, NHEJ1, NRAS, ORAI1, PIK3R1, PLCG2, PNP, PRF1, PRKDC, PTPRC, RAB27A, RAG1, RAG2, RET, RFX5, RFXANK, RFXAP, RMRP, SH2D1A, SKIV2L, SLC37A4, STAT1, STAT3, STAT5A, STAT5B, STX11, STXBP2, TAP1, TAP2, TAPBP, TNFRSF13B, TTC37, UNC13D, UNG, WAS, XIAP, ZAP70

Микро-РНК

- Малые эндогенные РНК, регулируют экспрессию генов через влияние на трансляцию и стабильность мРНК.
- Участвуют в дифференцировке клеток, онкогенезе, метастазировании, в функционировании **иммунной системы**
- Являются эффективными мишенями для терапии (антагонисты miR-122 в лечение HCV)
- Изучено > 1000 miRNA у человека, в **Т-клетках >100**
- Регулируют продукцию цитокинов, дифференцировку и активацию клеток иммунной системы



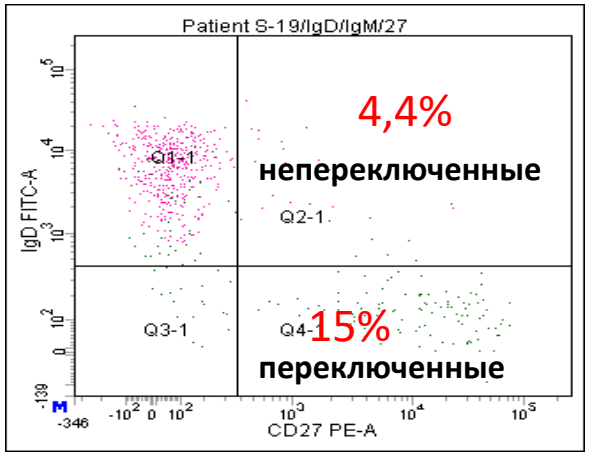
Регуляторная роль miRNA в Т-клетках

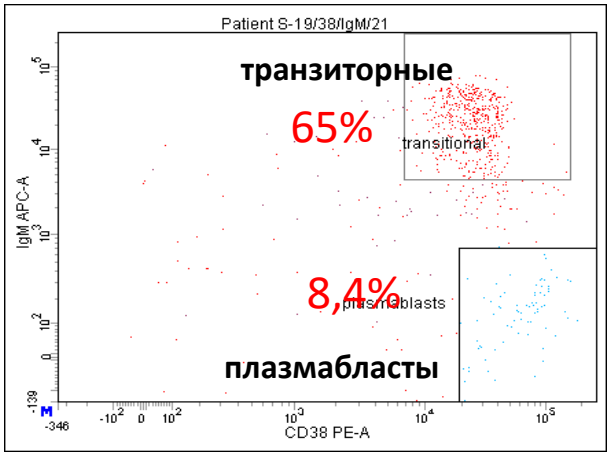


D. Baumjohann et all

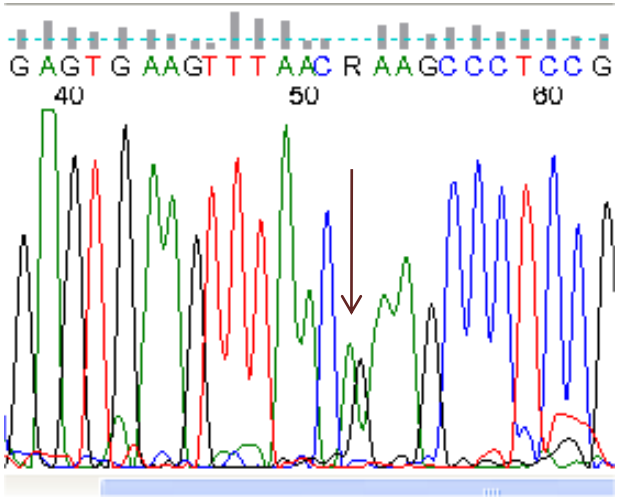
Пациент с мутацией PIK3CD

B-лимфоциты

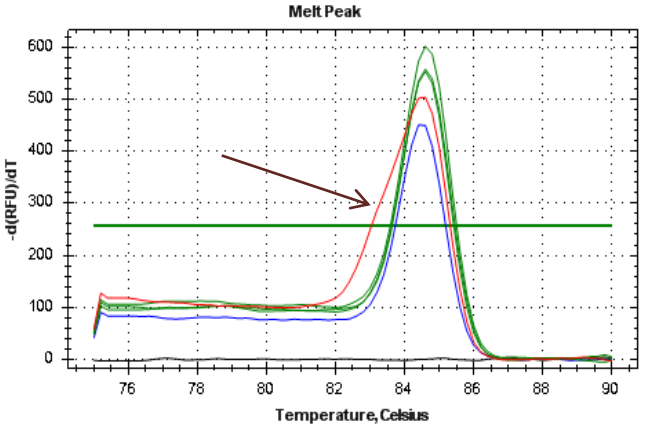




Пациент 17 лет. Долгое время ставился диагноз ОВИН. Пневмонии, хроническая Эпштейн-Барр вирусная инфекция, лимфаденопа-тия, лимфопролиферация.
Транзиторные B-лимфоциты – 65%±12
IgM - 7 г/л, IgG – 4,5 г/л



Секвенирование по Сенгеру ПЦР фрагмента гена PIK3CD



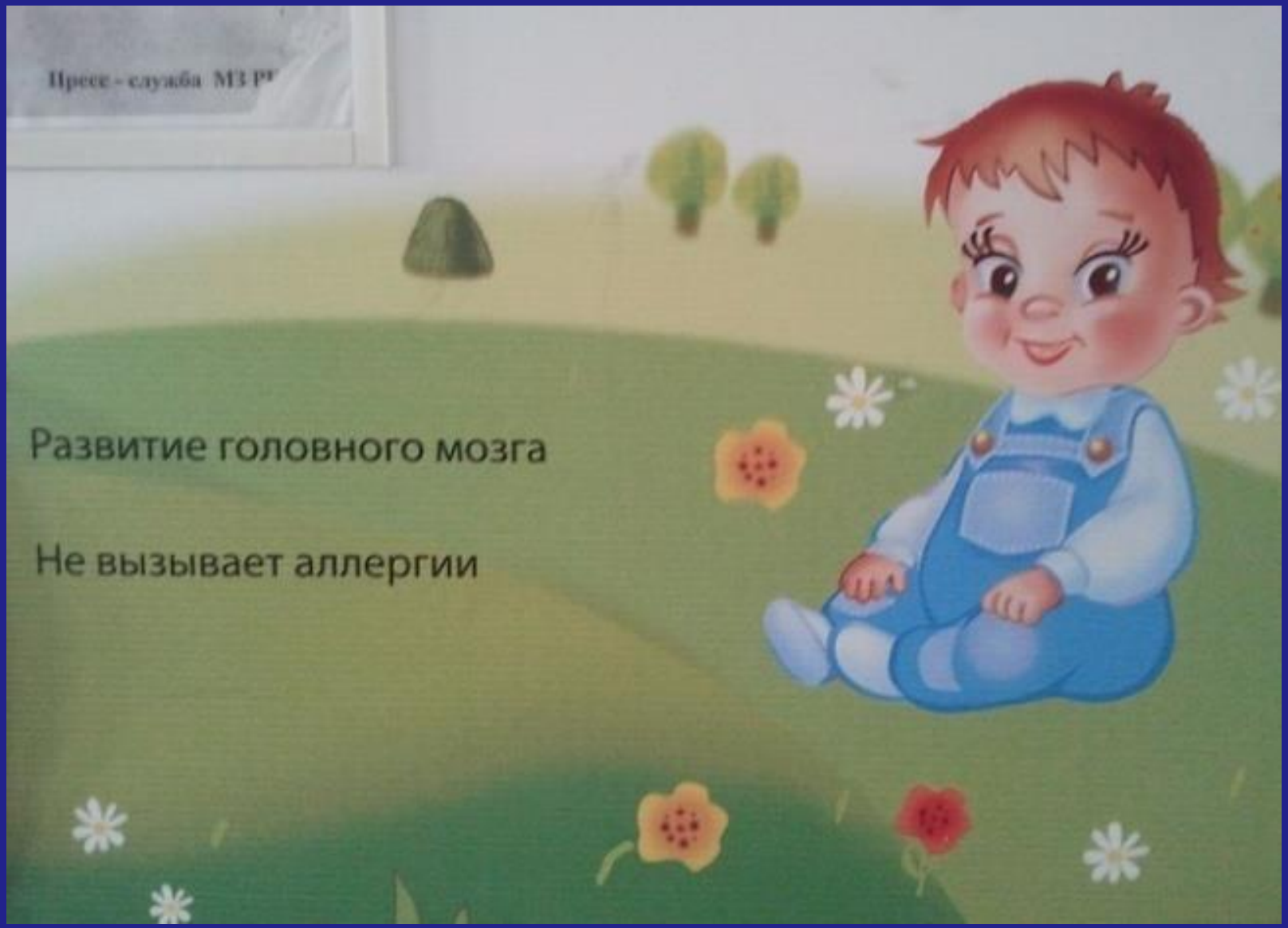
Кривая плавления ПЦР продуктов гена PIK3CD

Проведено полноэкзомное секвенирование на Illumina Hisseq2000. Обнаружена гетерозиготная миссенс мутация **E1021K** в гене субъединицы **p110δ PIK3** (c.3061 G>A).

Будущее диагностики ПИД

- Универсальный неонатальный скрининг для всех ПИД
- Стандартизация панелей и методов для цитометрической диагностики (СОПы, тщательная селекция оптимальных клонов антител и флуорохромов, создание базы данных референсных значений для субпопуляций)
- Удешевление и сокращение времени молекулярной диагностики.

ПРИЕМ АНАЛИЗОВ
ЕЖЕДНЕВНО
(НЕ БОЛЕЕ 10 КГ.)


Пресс - служба МЗ РТ
Развитие головного мозга
Не вызывает аллергии

ОТДЕЛЕНИЕ ИММУНОЛОГИИ И АЛЛЕРГОЛОГИИ

З В О Н И Т Е!!!!!!!

+ 7(499)259-0151

+ 7(499)259-0140

+ 7(499)259-9490

и пишите!!!!

prodeus@mail.ru