

# Spezielle Diagnostik bei Verdacht auf Immundefekt

Eva Maria Jacobsen

Immunologielabor Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm



DSAI Dresden 25.03.2023

Universitätsklinikum  
Carl Gustav Carus  
DIE DRESDNER.



universität  
uulm

## Manchmal ist es einfach.....



ulm university universität  
uulm



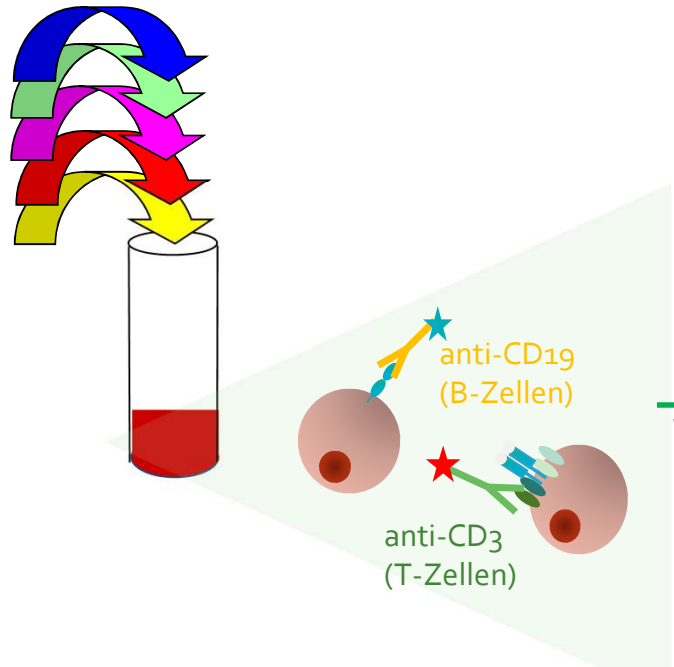
A., ♂ 6 Monate alt \*7`2021

- 11`2021, 4 Mo: Notaufnahme, seit Sommer 2021 rezidivierende Bronchitiden, V.a. Penicillinallergie → Beendigung der Antibiose, da fieberfrei
- Erneute Vorstellung 2 Wochen später, protrahierter Verlaufs der Bronchitis
- → Immunglobulin-Diagnostik:
  - IgG **< 0,4 g/l** (Ref. Bereich 4,5-9,2)
  - IgA **< 0,05 g/l** (Ref. Bereich 0,2-1,0)
  - IgM 0,19 (Ref. Bereich 0,19-1,46)

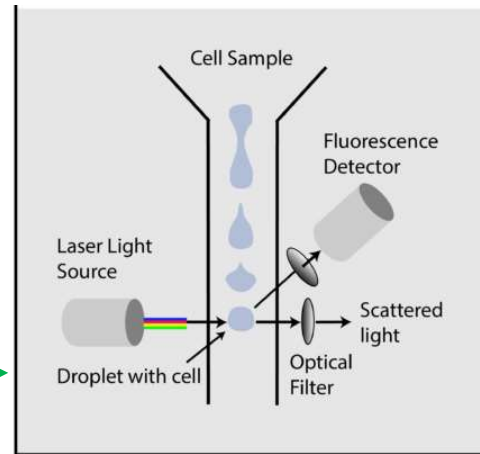
# Kurzer Ausflug in die Durchfluss-Zytometrie (= FACS *fluorescence activated cell sorting*)



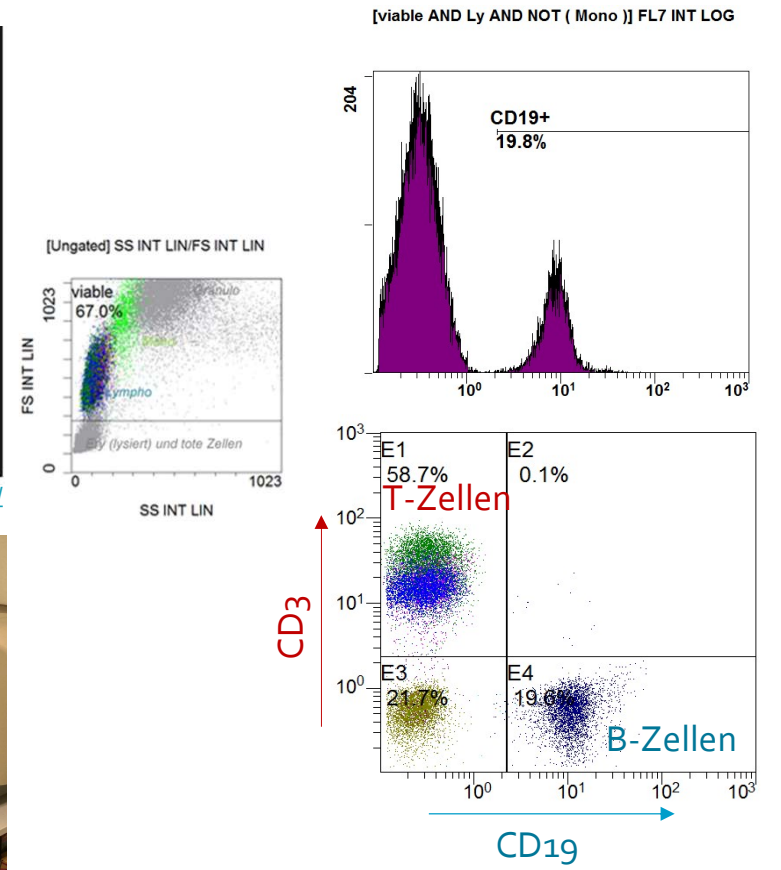
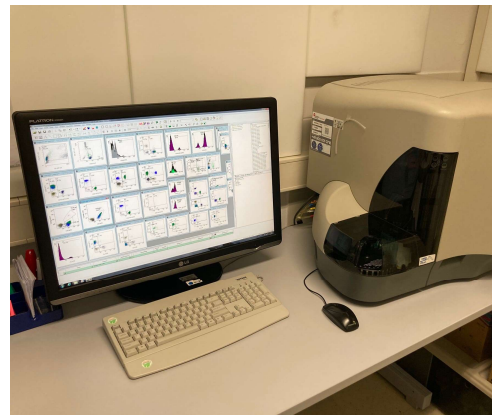
ulm university universität  
**uulm**



Erylyse,  
Wash



<https://cellcartoons.net/chapter/flow-cytometry/>



Bis zu 10 verschiedene Antikörper/ Fluorochrome pro tube

CD = cluster of differentiation

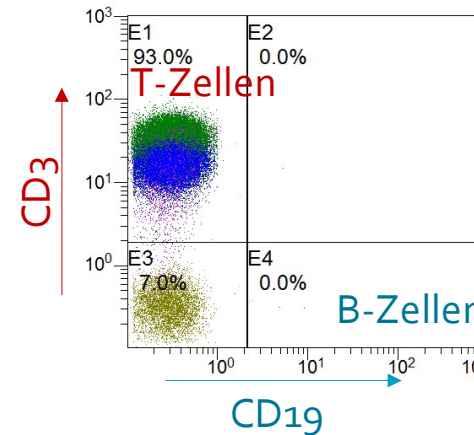
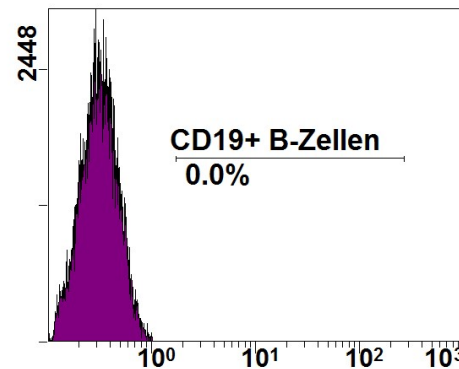
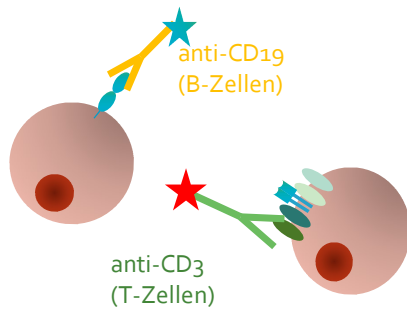
Manchmal ist es einfach.....



ulm university universität uulm

UNIVERSITÄTS  
KLINIKUM  
ulm

A., ♂ 6 Monate alt Weiterführende Diagnostik: Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung



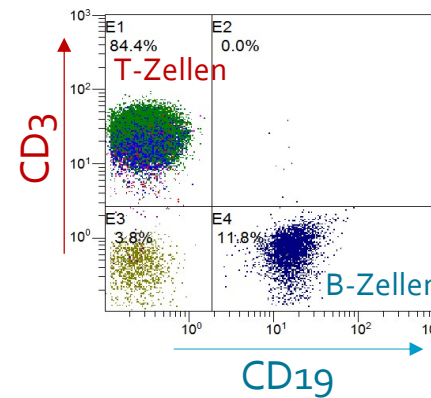
→ x-chromosomal vererbte (x-linked) **Agammaglobulinämie (XLA) / M. Bruton**

- 1952 erstmalig beschrieben (erster beschriebener Immundefekt!)
- Prävalenz 1:200.000
- Onset Symptome: frühe Kindheit
- Mutation im BTK (Bruton-Tyrosinkinase) –Gen (*Bestätigung durch Genetik*)
- **Therapie: Immunglobulin-Substitution**

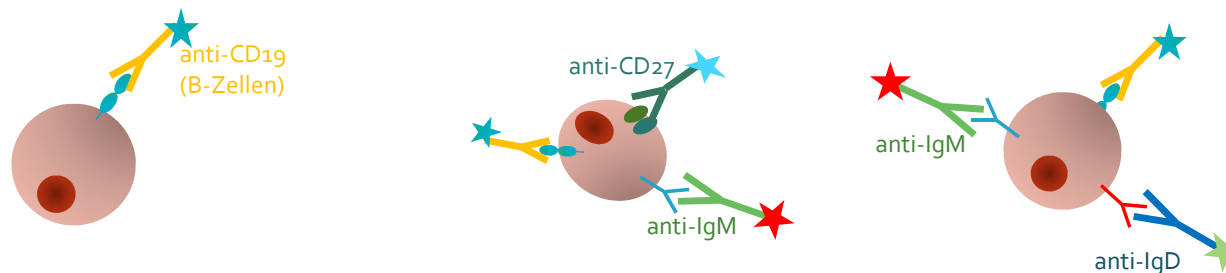
## Oft deutlich komplizierter

L. ♀ 17 Jahre alt

- Rezidivierende Infekte der oberen Atemwege
- Rezidivierende orale Aphten
- Panaritium mit schwerer Lymphangitis li Unterarm
- → Immunglobulin-Diagnostik:
  - IgG 2,7 g/l (Ref. Bereich 5,5-15,8)
  - IgA <0,05 g/l (Ref. Bereich 0,61-3,48)
  - IgM 0,23 (Ref. Bereich 0,23-2,59)



## Weiterführende Diagnostik: Durchflusszytometrische Detail- B-Zell Immunphänotypisierung



Außerdem Antikörper gegen:  
- CD20, CD21, CD38, IgA, IgG.....

# B-Zell Entwicklung



- Transitionale

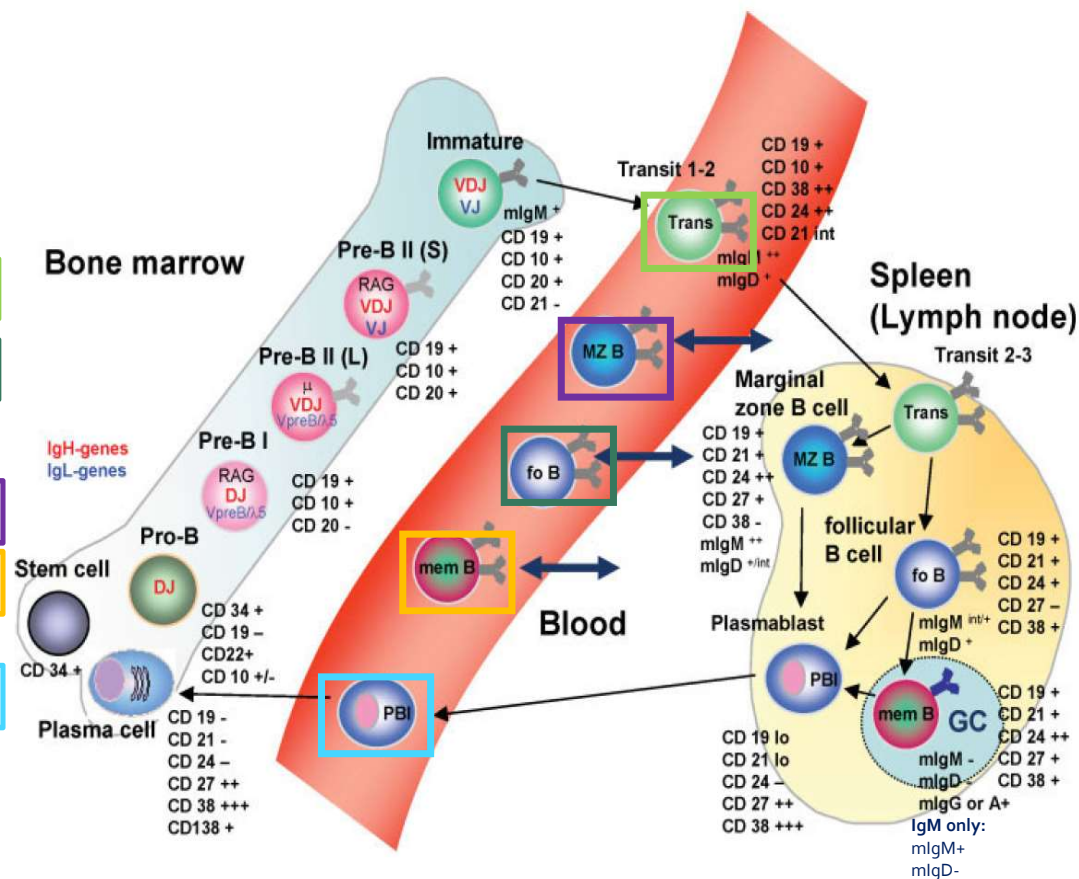
- Naïve (follicular)

Memory B-cells (CD27+):

- Marginal zone like

- Switched memory

- Plasmablasts

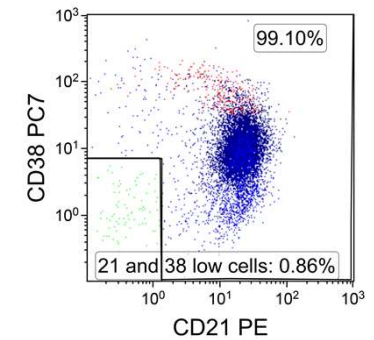
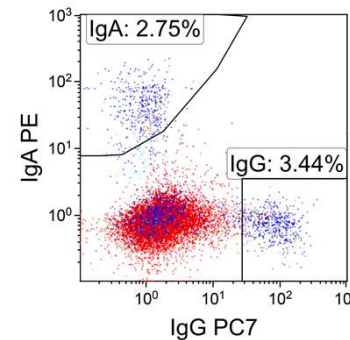
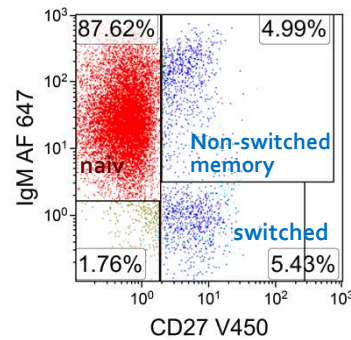
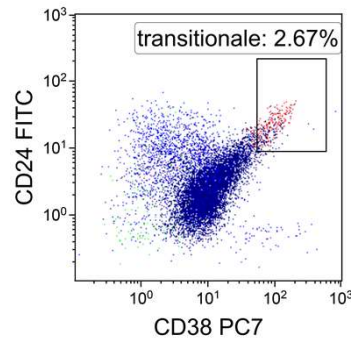


Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. Warnatz K, Schlesier M. Cytometry B Clin Cytom. 2008 Sep;74(5):261-71. (modified)

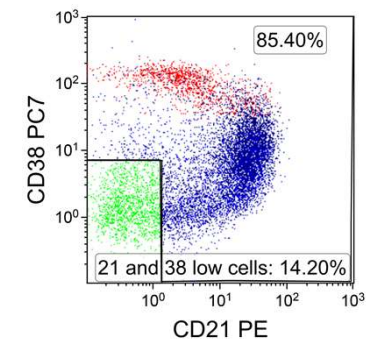
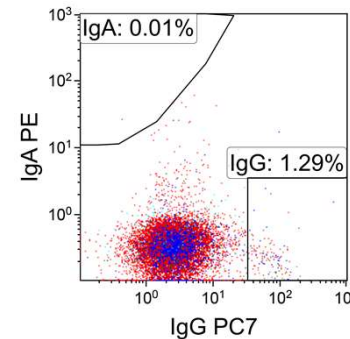
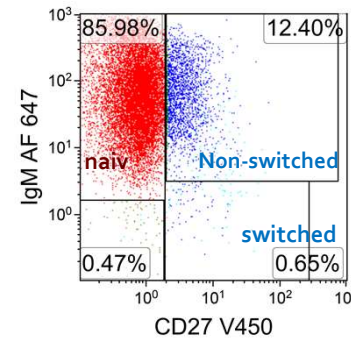
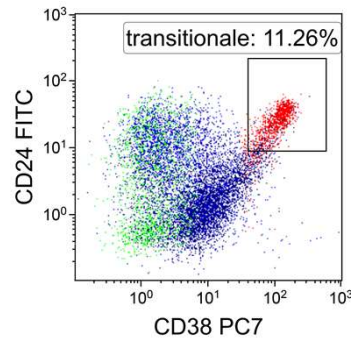
L., 17 Jahre alt

## Weiterführende Diagnostik: Durchflusszytometrische **Detail - B-Zell Immunphänotypisierung**

**Kontrolle**



**Patientin**



→ **Common variable immunodeficiency (CVID)**

# CVID – common variable immunodeficiency

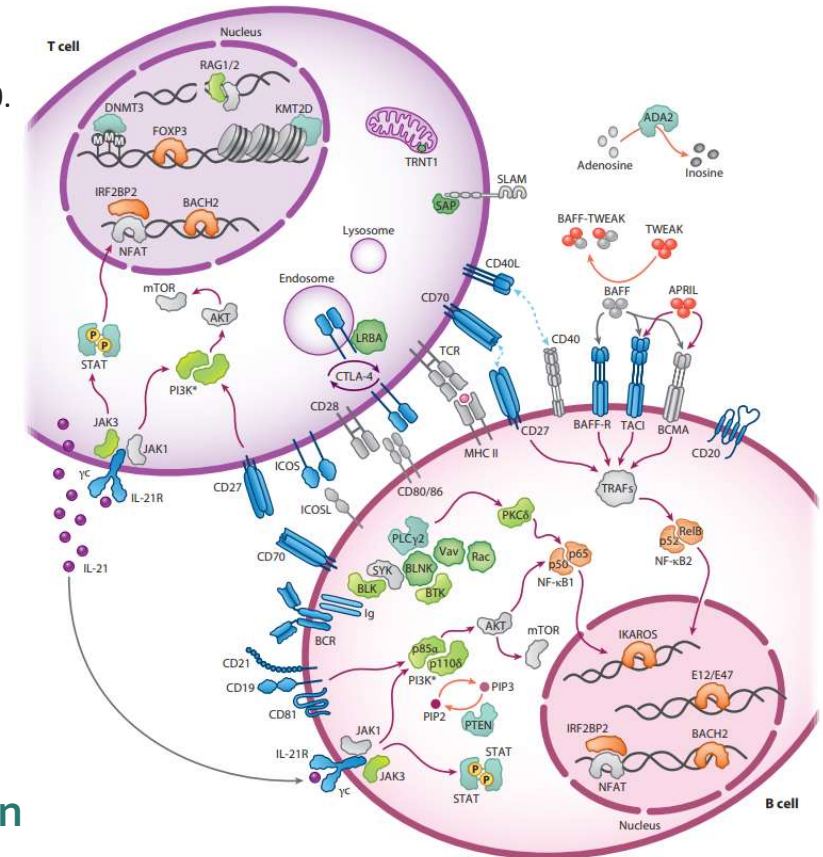


Peng XP, Caballero-Oteyza A, Grimbacher B. Common Variable Immunodeficiency: **More Pathways than Roads to Rome.** Annu Rev Pathol. 2023 Jan 24;18:283-310.

## → Variabel im Phänotyp und Genetik

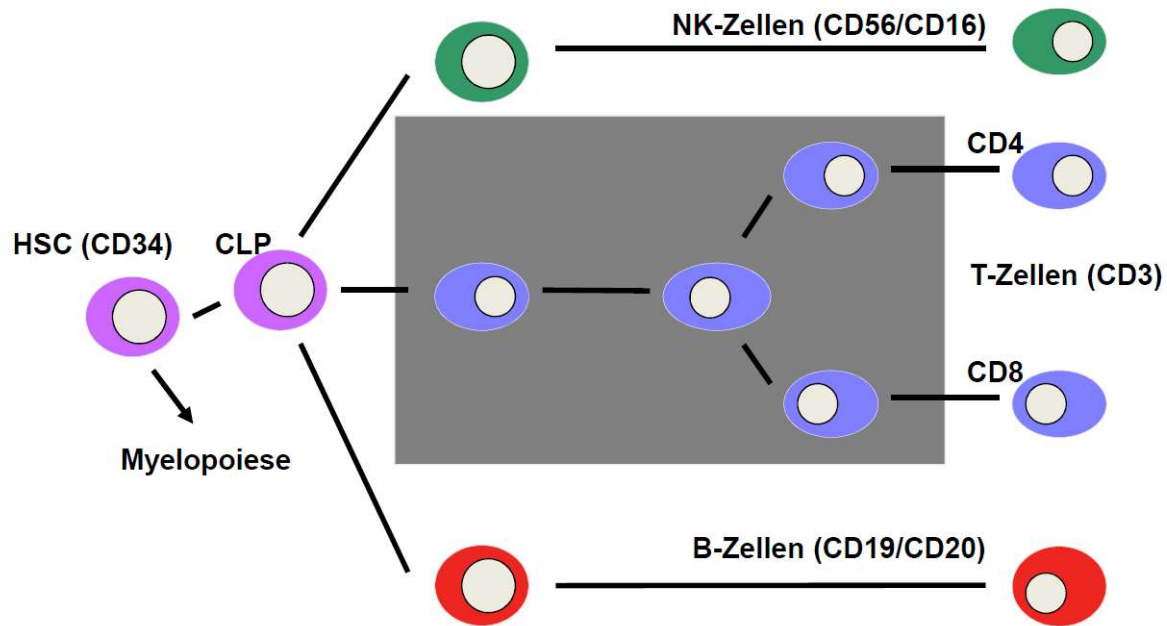
- Prävalenz 1:25000
  - Onset Symptome: variabel, oft erst in später Kindheit/ Jugend
  - Störung der humoralen Immunfunktion
- +/-
- Immundysregulation

Therapie: Immunglobulin-Substitution, ggf. Immunsuppression





# Diagnostik bei schweren kombinierten Immundefekten (SCID)



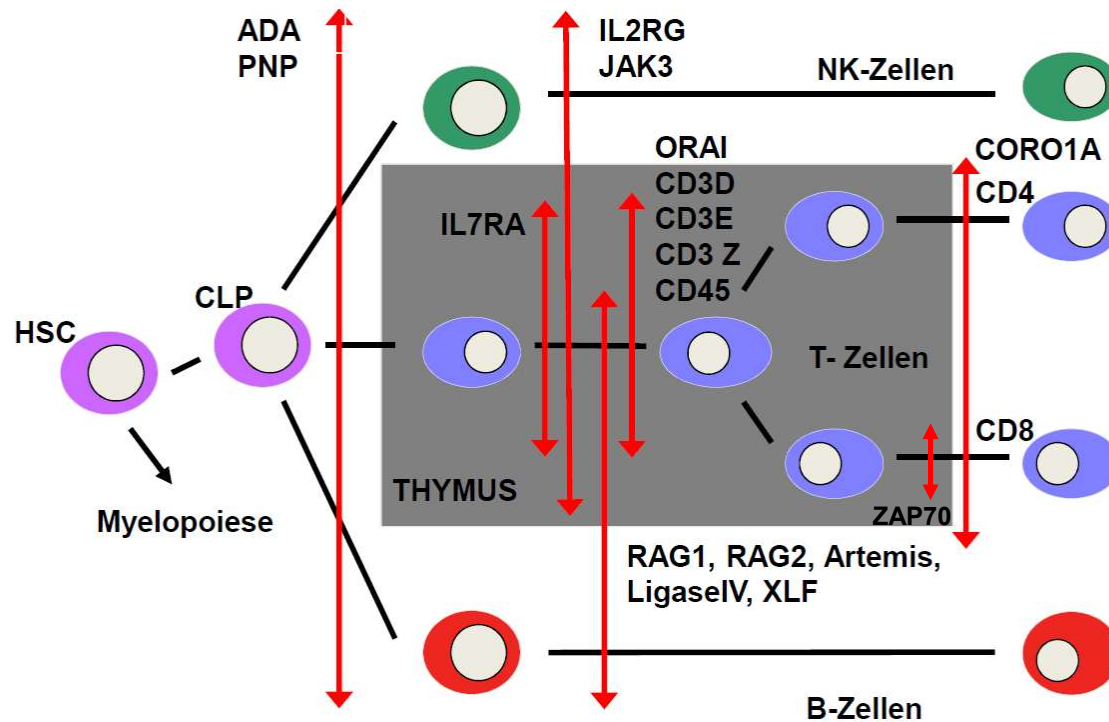
# Diagnostik bei schweren kombinierten Immundefekten (SCID)



ulm university universität  
uulm



## Molekulare Differenzialdiagnose

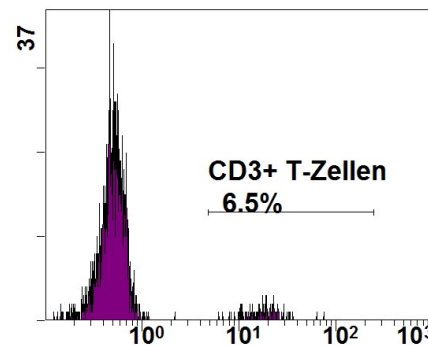
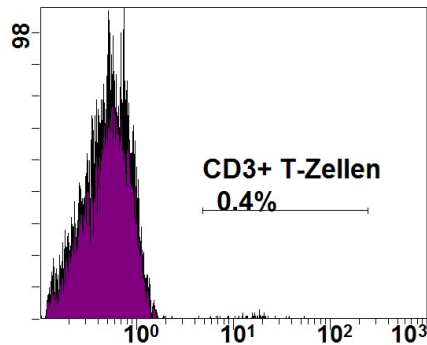
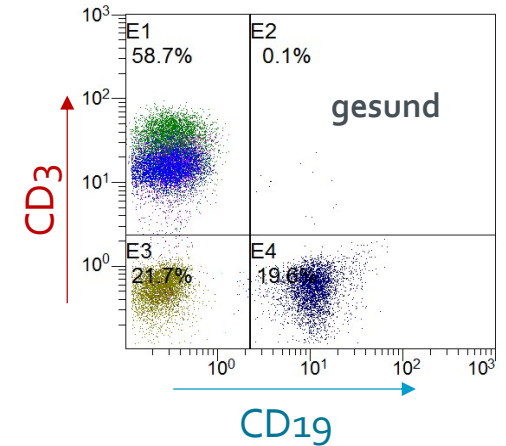
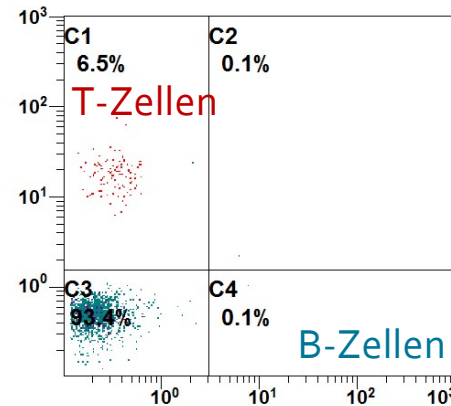
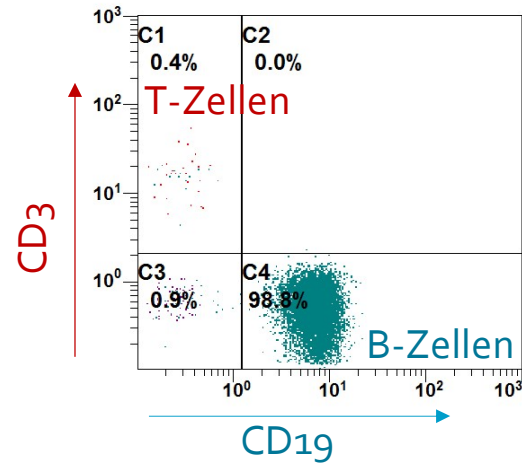


- Inzidenz: 1:50.000 – 1:100.000 Neugeborene/Jahr
- Onset Symptome: Neugeborenenphase / früh nach Geburt
- schwerste virale (opportunistische) Infektionen

Therapie: Stammzelltransplantation

Seit 2019: Neugeborenenenscreening

# Diagnostik bei schweren kombinierten Immundefekten (SCID)



R. ♂, x-linked SCID  
(IL2R $\gamma$  Defekt)

H. ♂, SCID  
(RAG1 Defizienz)

*Klärung, ob T-Zellen maternalen  
oder autologen Ursprungs*

# Was tun, wenn phänotypische Auffälligkeiten unklar?



ulm university universität  
**uulm**



S. 1 Jahr 9 Monate alt

- Schweres Ekzem
- Generalisierte Lymphadenopathie
- Rezidivierende Infektionen
- Schwere Gedeihstörung



Leukozyten:	18700 / $\mu$ l		4700-10200 / $\mu$ l <sup>2</sup>		Verantwortlich für die Bestimmung von Leuko- und Lymphozyten: Institut für klinische Chemie		
Lymphozyten:	9537 / $\mu$ l		1700-5700 / $\mu$ l <sup>2</sup>				
<b>B-Lymphozyten</b>		<b>Absolut</b>	<b>Abw.</b>	<b>Referenzbereich</b>	<b>von allen CD4+ T-Zellen</b>	<b>Abw.</b>	<b>Referenzbereich</b>
CD19+	50.1 %	4778 / $\mu$ l	+	310-1600 / $\mu$ l <sup>2</sup>	CD45RA+CCR7+ (naive)	9.9 %	51-81 % <sup>2</sup>
<b>NK-Zellen</b>					CD45RA+CCR7- (eff)	0.9 %	0.4-4.5 % <sup>2</sup>
CD3-CD56+CD16+	6.1 %	582 / $\mu$ l		110-600 / $\mu$ l <sup>2</sup>	CD45RO+CCR7+ (cen. mem.)	55.1 %	10-21 % <sup>2</sup>
CD3-CD56+CD16+DR+	0.3 %	29 / $\mu$ l		0-1.6 % <sup>2</sup>	CD45RO+CCR7- (eff. mem.)	31.8 %	4.3-18 % <sup>2</sup>
<b>NK-like T-cells</b>					CD45RA+RO-	10.8 %	52-81 % <sup>2</sup>
CD3+CD56+CD16+	0.2 %	19 / $\mu$ l		4-90 / $\mu$ l <sup>2</sup>	CD45RO+RA-	86.8 %	14-42 % <sup>2</sup>
<b>T-Lymphozyten</b>					CD45RA+RO+	0.9 %	0-2.5 % <sup>2</sup>
CD3+	43.9 %	4187 / $\mu$ l	+	1200-3900 / $\mu$ l <sup>2</sup>	Ratio CD45RA/CD45RO	0.1	
CD3+DR+	11.5 %	1097 / $\mu$ l	+	0-4.1 % <sup>2</sup>	HLA DR+	25.2 %	0-4 % <sup>2</sup>
CD3+CD4+	39.8 %	3796 / $\mu$ l	+	650-2400 / $\mu$ l <sup>2</sup>	<b>von allen CD8+ T-Zellen</b>		
CD3+CD8+	3.0 %	286 / $\mu$ l	-	410-1400 / $\mu$ l <sup>2</sup>	CD45RA+CCR7+ (naive)	31.6 %	43-80 % <sup>2</sup>
Ratio CD4/CD8	13.3		+	1.1-3.3 <sup>2</sup>	CD45RA+CCR7- (eff)	12.3 %	8-32 % <sup>2</sup>
CD3+CD4+CD8+	0.1 %	10 / $\mu$ l		3-30 / $\mu$ l <sup>2</sup>	CD45RO+CCR7+ (cen. mem.)	12.9 %	0.9-4.6 % <sup>2</sup>
CD3+CD4-CD8-	1.2 %	114 / $\mu$ l		90-430 / $\mu$ l <sup>2</sup>	CD45RO+CCR7- (eff. mem.)	39.5 %	2.6-19 % <sup>2</sup>
TCRa $\beta$ +	43.3 %	4130 / $\mu$ l	+	1000-3600 / $\mu$ l <sup>2</sup>	CD45RA+RO+	2.2 %	0-5.8 % <sup>2</sup>
TCR $\gamma$ d+	0.6 %	57 / $\mu$ l	-	90-360 / $\mu$ l <sup>2</sup>	HLA DR+	27.7 %	0-11 % <sup>2</sup>
TCRa $\beta$ +CD4-CD8-	0.7 %	67 / $\mu$ l	-	0.8-2.2 % <sup>2</sup>	<b>Sonstige</b>		
TCR $\gamma$ d+CD4-CD8-	0.5 %	48 / $\mu$ l	-	2-10 % <sup>2</sup>	DR+	60.7 %	18-35 % <sup>2*</sup>
<b>Interne Qualitätskontrolle (T+B+NK entspricht 100+-5%): 100.1 %</b>					* abhängig vom B-Zellanteil 1 Shearer et al 2003, 2 Eigene		
Alle Populationen beziehen sich auf CD45+ Lymphozyten (falls nicht anders angegeben) Seit dem 16.09.2019 bleiben CD45RA+RO+ T-Zellen bei der Differenzierung der naiv/memory Subpopulationen unberücksichtigt							

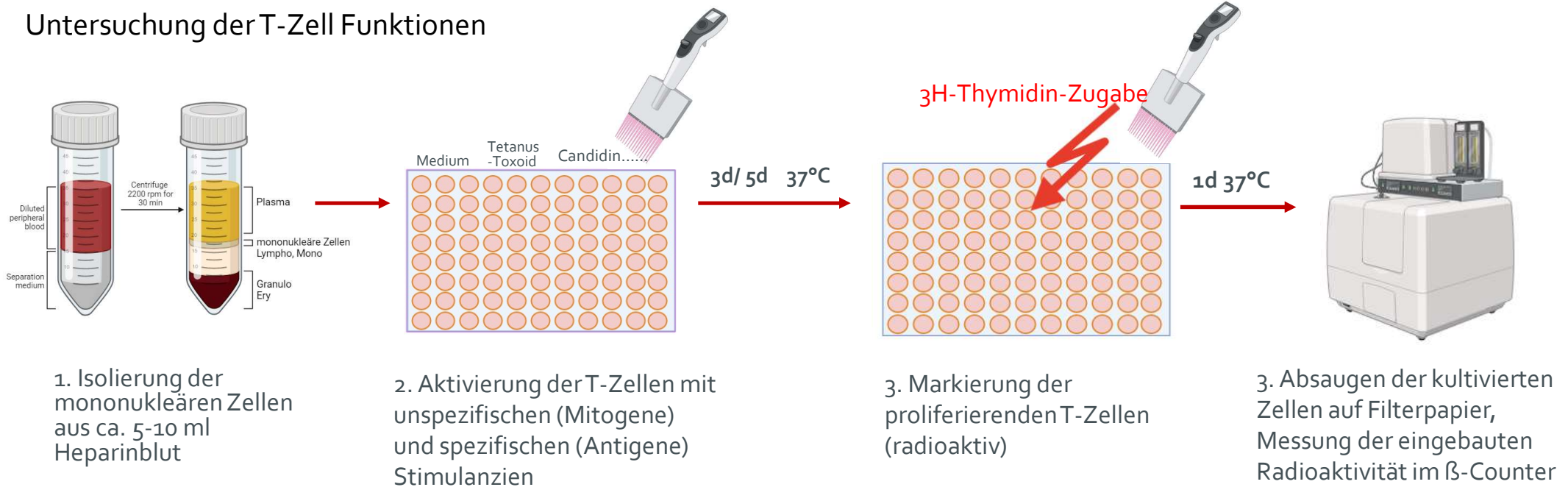
# Funktionelle Analysen helfen weiter



ulm university universität  
**uulm**



## Untersuchung der T-Zell Funktionen



# Funktionelle Analysen helfen weiter



ulm university universität  
**uulm**

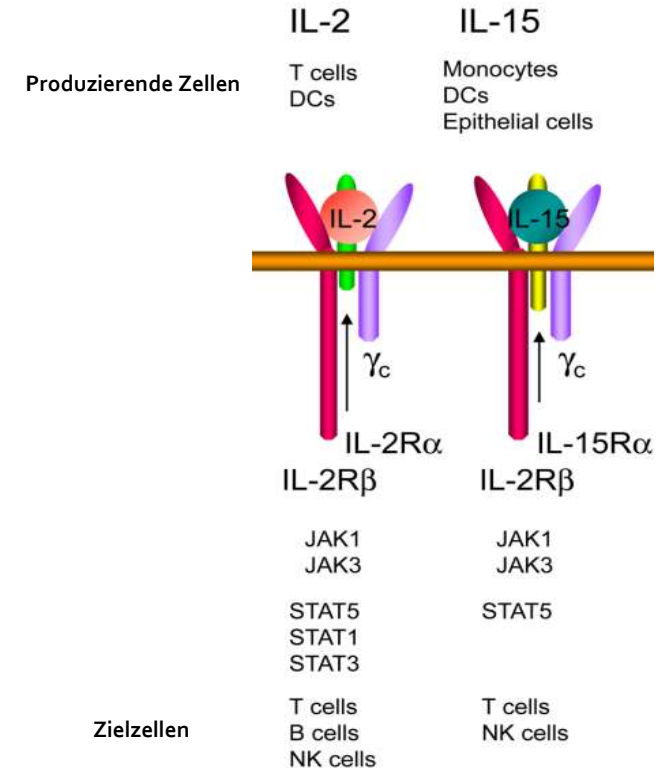
**U** UNIVERSITÄTS  
KLINIKUM  
ulm

S. 1 Jahr 9 Monate alt

Methode: T-Zellfunktion in vitro (Proliferation) mit 3H Thymidin

	Patient			Tageskontrolle		
	c.p.m.	SI	% der Kontrolle	c.p.m.	SI	Mindestwerte der Tageskontrolle <sup>1</sup>
<b>(3 Tage)</b>						
background	157	1		182	1	
IL 2	<b>129</b>	1 *	5	3092	17	≥ 5
PHA	73104	466 *	99	85811	471	≥ 80
CD3CD28 beads	47314	301 *	65	84691	465	≥ 60
<b>(5 Tage)</b>						
background	128	1		94	1	
Tetanus	<b>282</b>	2	4	5242	56	≥ 15
MLC pool	<b>294</b>	2	1	14773	157	≥ 15
Candidin	<b>188</b>	1	1	22045	235	≥ 5
CMV -posAG	125	1	0	77354	545	≥ 5
Adeno -posAG	<b>162</b>	1	2	11824	83	≥ 5
CMV Adeno -negAG	110	1		142	1	
PPD						≥ 5

1 aus eigenen Ansätzen gesunder, freiwilliger, adulter Kontrollen  
\* Normwerte ≥ 30% der Tageskontrolle (Interpretation abhängig von Tageskontrolle)  
\*\* Antigen-Stimulation 5 Tage: Interpretation abhängig vom Impf-/Expositionsstatus und Tageskontrolle



Genetik: whole exome sequencing > **IL2Rβ Mutation**

Therapie: Stammzelltransplantation

Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. Nat Rev Immunol. 2009 Jul;9(7):480-90. doi: 10.1038/nri2580. PMID: 19543225; PMCID: PMC2814538.

## Funktionelle Analysen können auch in erster Linie sinnvoll sein



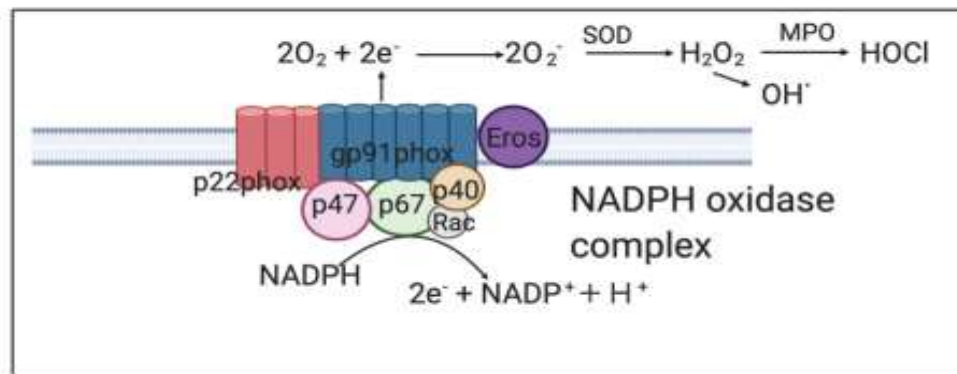
ulm university universität  
uulm



G. ♂ neugeboren, Verdacht auf **Septische Granulomatose (chronic granulomatous disease, CGD)**

Bruder und Onkel betroffen

Pränataldiagnostik: CyBB (gp91-phox) Mutation



Yu HH, Yang YH, Chiang BL. Chronic Granulomatous Disease: a Comprehensive Review. Clin Rev Allergy Immunol. 2021 Oct;61(2):101-113. doi: 10.1007/s12016-020-08800-x. PMID: 32524254.

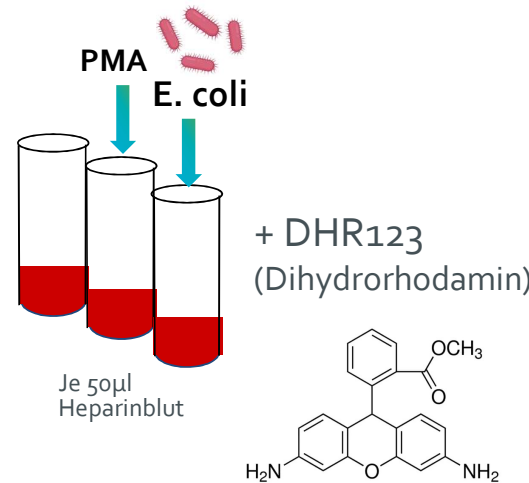
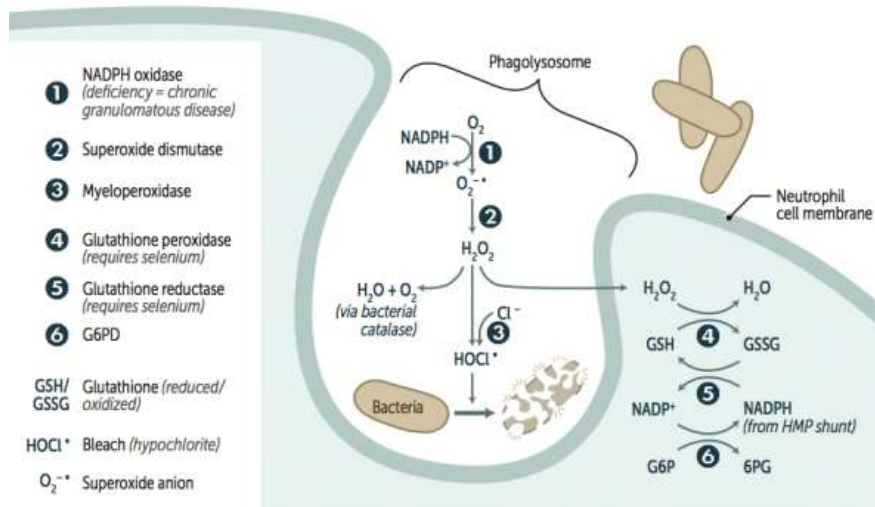
- Inzidenz: ca. 1:200.000
- X-linked (bei gp91-phox, 66% der CGD-Fälle) oder AR
- Onset Symptome: Kleinkind-Alter
  - schwere bakterielle Infektionen
  - Pilzinfektionen, Aspergillosen
  - Abszesse, Granulome (gastro-intestinal)
  - Colitis
  - anormale Wundheilung, exzessive Granulation

**Therapie > Stammzelltransplantation**

# Funktionelle Analysen können auch in erster Linie sinnvoll sein

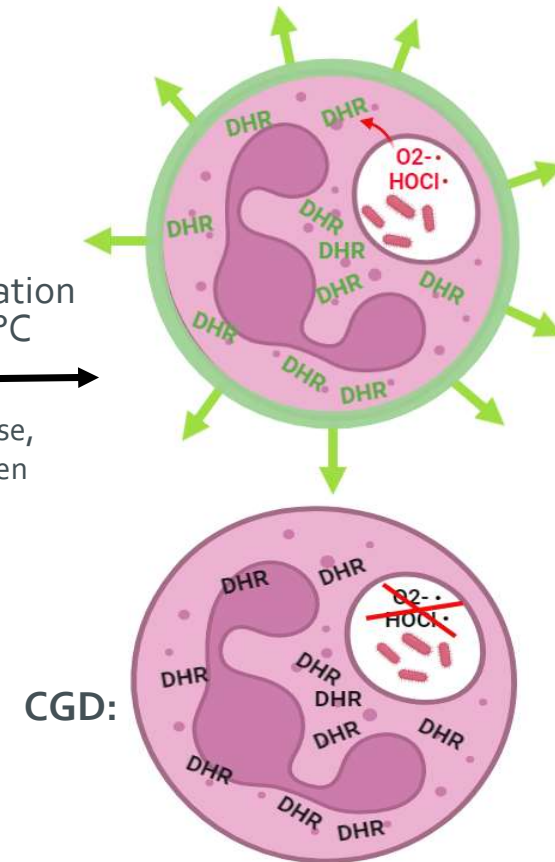


## Diagnostik bei V.a. Septische Granulomatose (chronic granulomatous disease, CGD): Burst-Assay



Inkubation  
20' 37°C

Ery-Lyse,  
waschen



[Respiratory burst activity. How to measure | Bioquochem](#), abgerufen am 13.03.2023

PMA=  
Phorbol-myristat-acetat

Spezielle Diagnostik bei V.a. Immundefekt | Eva-Maria Jacobsen | DSAI Dresden 25.03.2023



# Funktionelle Analysen können auch in erster Linie sinnvoll sein



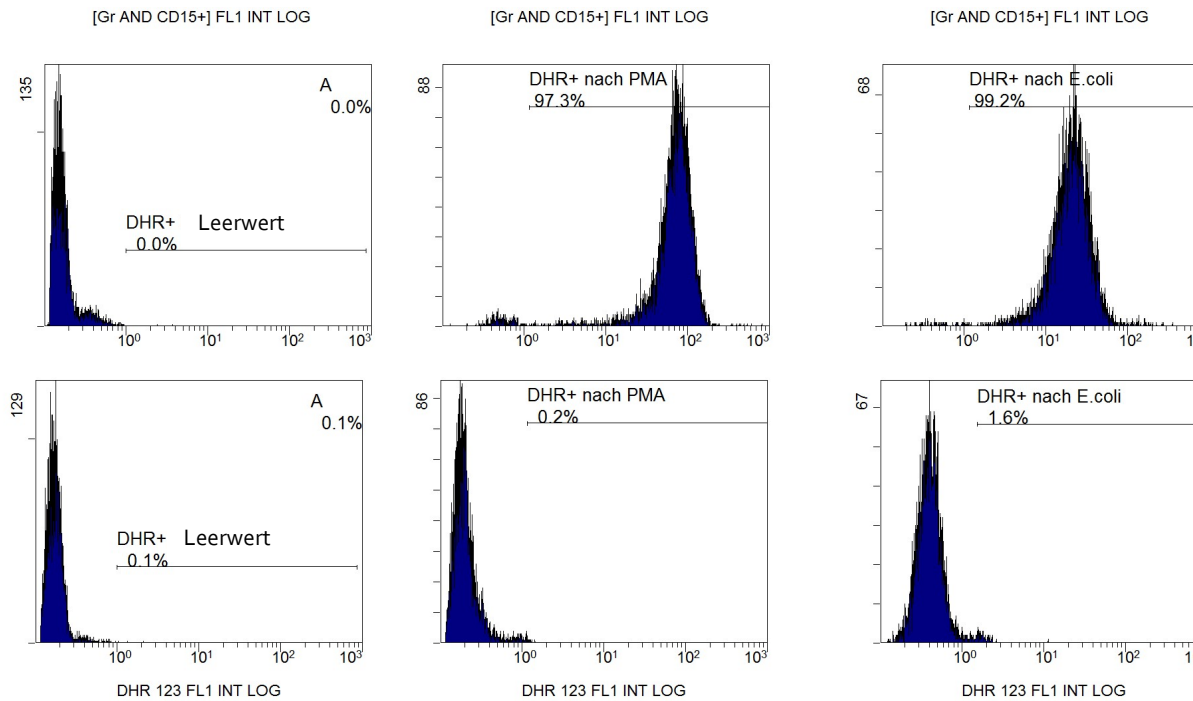
ulm university universität  
uulm



## Diagnostik bei V.a. Septische Granulomatose (chronic granulomatous disease, CGD):

### Burst-Assay

Gesunde  
Kontrolle



**Befund vom 21.04.2022:**

Deutlich eingeschränkter oxidativer Burst. Bestätigung CGD-Syndrom.

Prof. Dr. A. Schulz

Spezielle Diagnostik bei V.a. Immundefekt | Eva-Maria Jacobsen | DSAI Dresden 25.03.2023

# Manchmal führen Analysen in die Irre...



ulm university universität  
uulm

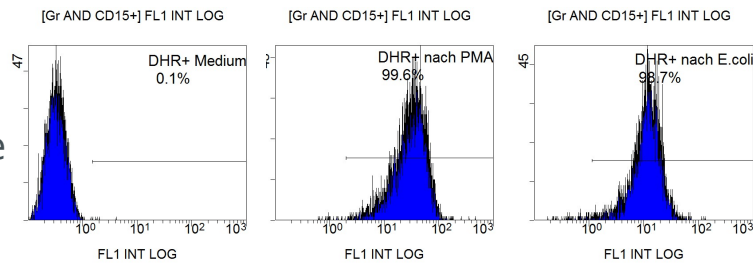


M. 10 Jahre alt  
Leberabszess, V.a. Immundefekt

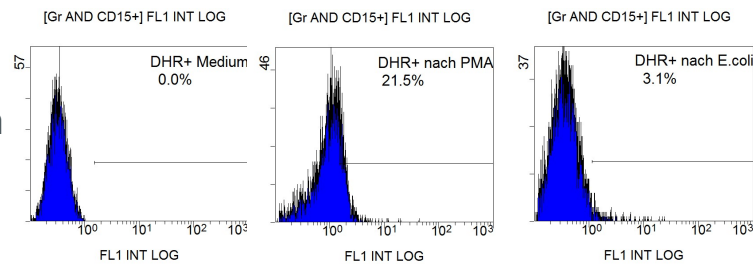
Genetik: **kein CGD!**

- Mutation in Myeloperoxidase (MPO) –Gen
- Komplette MPO-Defizienz

Gesunde  
Kontrolle



Patientin

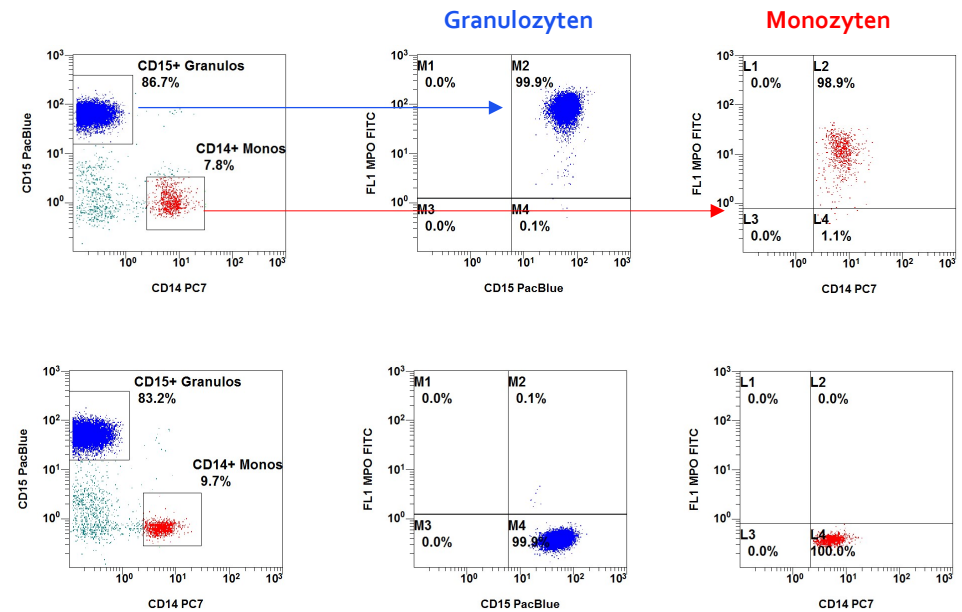


**Befund vom 17.08.2021:**

Reduzierter, wenn auch nachweisbarer oxidativer Burst der Granulozyten.

**Beurteilung:**

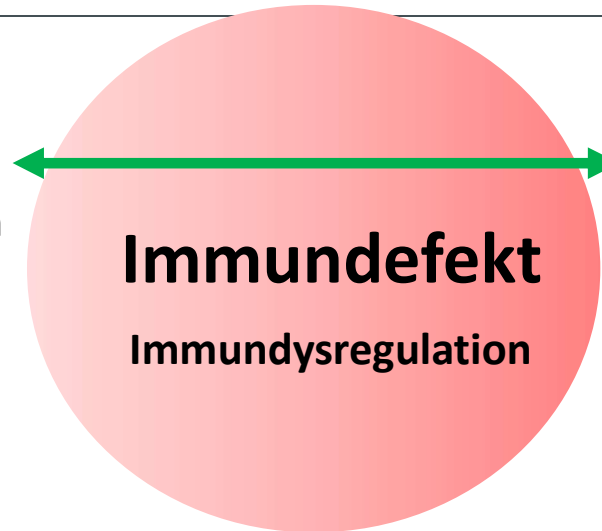
Pathologischer oxidativer Burst. Auch im Zusammenhang mit der klinischen Präsentation autosomal rezessives CGD-Syndrom möglich. Kurzfristige Kontrolle und weitere Abklärung empfohlen (Molekulargenetik, NET-Formation).



- Inzidenz: ca. 1:2000-4000
- Klinische Konsequenzen meist moderat, oft asymptomatisch
- Schwere Infektionen in ca. 5% der Betroffenen

## Phänotypische Analysen

- Lymphozyten-Populationen: T-, B, NK Zellen
- T- und B-Zell Subpopulationen
- T-Zell Rezeptor Repertoire
- T-Helfer Subpopulationen
- ...



## Funktionelle Analysen

- Granulozytenfunktion
- T-Zell Funktion
- NK-Zell Funktion
- ...

- **Proteinexpression bei V.a. monogenetische Erkrankungen, z.B.:**

- Leukozytenadhäsionsdefekt (LAD1): *Leukozytenfunktionsantigen 1 (LFA1), CD18*
- Hyper IgM Syndrom: *CD40 Ligand / CD40 Rezeptor*
- Wiscott-Aldrich Syndrom: *WAS-Protein*
- IPEX-Syndrom (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked): *FoxP3*
- Perforin-Defekt: *Perforin*
- ...

# Vielen Dank!

## Pädiatrische Immunologie / Stammzelltransplantation Ulm

**Ansgar Schulz**

**Manfred Hönig**

**Aleš Janda**

**Mehtap Sirin**

**Kerstin Felgentreff**

**Ingrid Furlan**

**Katharina Wustrau**

**Charlotte Rebholz**

**Ommo Maus**

**Klaus-Michael Debatin**

## Immunologielabor

**Andrea Hänsler**

**Gudrun Kirsch**

**Ulrike Tengler**

**Carmen Blum**

**Aloisia Tritschler**

**Eva-Maria Jacobsen**

