

Прикладная иммунология

Иммунодиагностика

Прикладная иммунология

1. Иммунодиагностика
2. Иммунопрофилактика
3. Иммунотерапия

- **Иммунодиагностика** – это использование иммунологических реакций для диагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний.
- **Иммунологические реакции** – это взаимодействие антигена со специфическими антителами.
- В любой **иммунологической реакции** выделяют две фазы:
 - 1) специфическую – взаимодействие антигена с антителом и образование комплекса АГ-АТ;
 - 2) неспецифическую – внешнее проявление реакции.

- 1) **Простые** - участвуют два компонента (антиген и антитело);
- 2) **Сложные** - участвуют три и более компонентов (антиген, антитело, комплемент и т. д.).

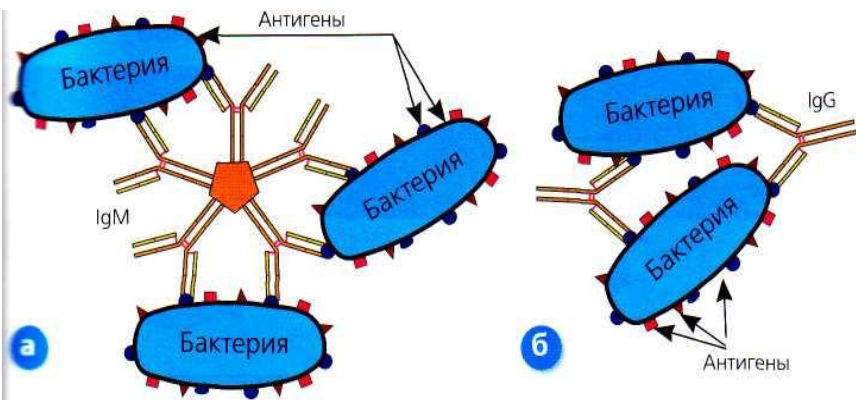
- 1) **Прямые** - результат учитывается визуально без специальных индикаторных систем;
- 2) **Непрямые** - для учета требуются специальные системы индикации.

Механизмы иммунологических реакций

- Реакция агглютинации
- Реакция преципитации
- Реакция связывания комплемента (РСК)
- Реакции с участием меченых антигенов или антител
- Реакции нейтрализации
- Реакции иммобилизации
- Проточная цитометрия

Реакции агглютинации

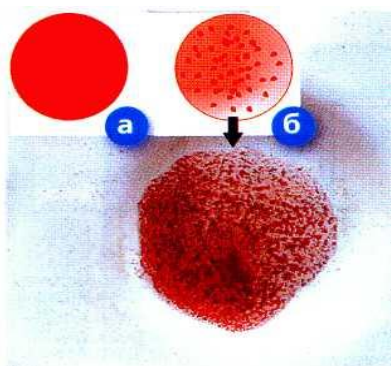
- **РА на стекле** (по Груберу) – для определения антигенных свойств при идентификации чистой культуры возбудителя в бактериологическом методе диагностики (качественная)
- **РА развернутая** (по Райту) – определение титра специфических антител в серологическом методе (количественная)
- **РНГА** (РПГА) – реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации
- **РОНГА** реакция обратной непрямой гемагглютинации
- **Реакция коагглютинации**
- **Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)**



Реакция агглютинации с IgM-антителами (А) и IgG-антителами (Б)



Развернутая реакция агглютинации и на стекле



Для определения групп крови:
а- отрицательная;
б- положительная

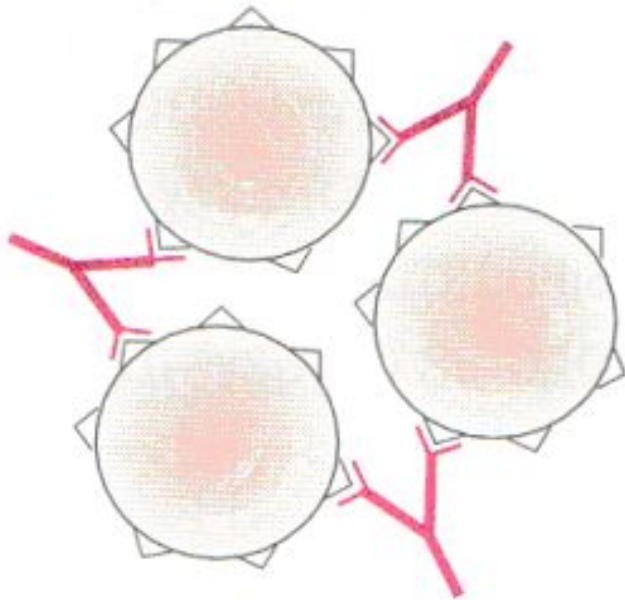
Реакция агглютинации (РА)

- (от лат. *agglutinatio* - склеивание) - склеивание корпускулярных антигенов (бактерий, эритроцитов, частиц с адсорбированными на них антигенами) антителами в присутствии электролитов (например, изотонического раствора хлорида натрия).
- Проявляется в виде хлопьев или осадка, состоящих из корпускул (например, бактерий) «склеенных» антителами.
- Реакцию агглютинации используют для следующих целей:
 - определение возбудителя, выделенного от больного;
 - определение противомикробных и других антител в сыворотке крови больного;
 - определение группы крови

Реакции агглютинации

РНГА (РПГА)

- Эритроцитарные
- Латексные (антигенные диагностикумы)

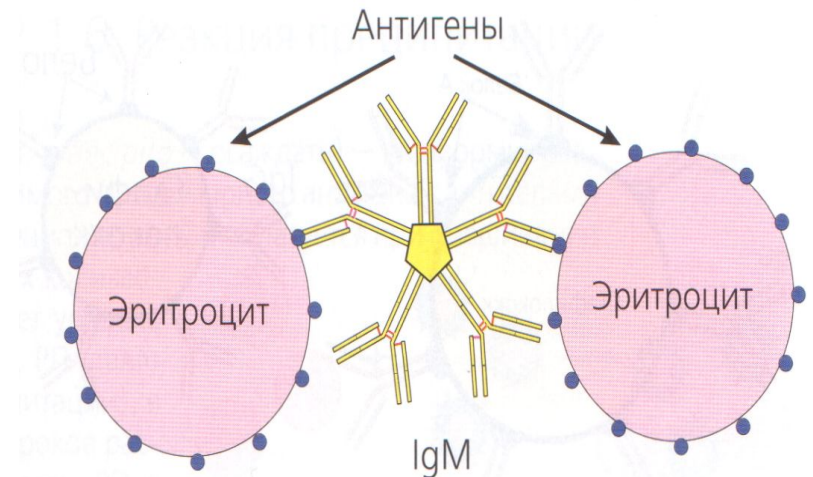


Образование
иммунных комплексов
с антигенными
частицами
(эритроциты, латекс)

РНГА (РПГА)

Позволяет выявить антитела сыворотки крови больного с помощью **антигенного эритроцитарного диагностикума**, который представляет собой эритроциты с адсорбированными на них антигенами (с О-антигенами брюшнотифозных бактерий).

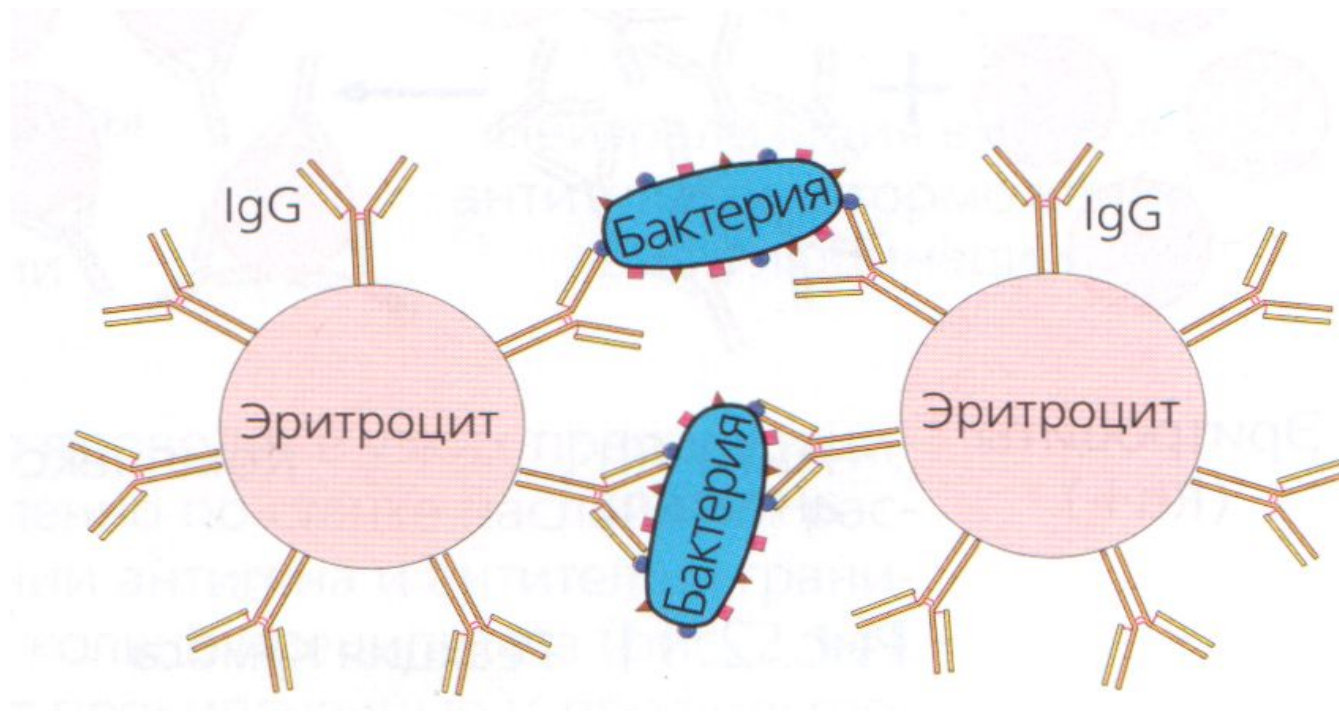
- Эритроциты (или частицы латекса) антигенами взаимодействуют с соответствующими антителами, что вызывает склеивание и выпадение на дно в виде фестончатого осадка («зонтика»).
- При отрицательной реакции эритроциты оседают в виде «пуговки» .



Реакции агглютинации

РОНГА

Эритроцитарные (антительные диагностикумы)



Реакции агглютинации

Реакция коаггутинации

- применяют для определения антигенов с помощью **антительного диагностикума** - антител, адсорбированных на белке А клеток стафилококка. Белок А стафилококков имеет сродство к Fc-фрагменту иммуноглобулинов, поэтому такие бактерии, обработанные иммунной диагностической сывороткой, неспецифически адсорбируют антитела сыворотки.

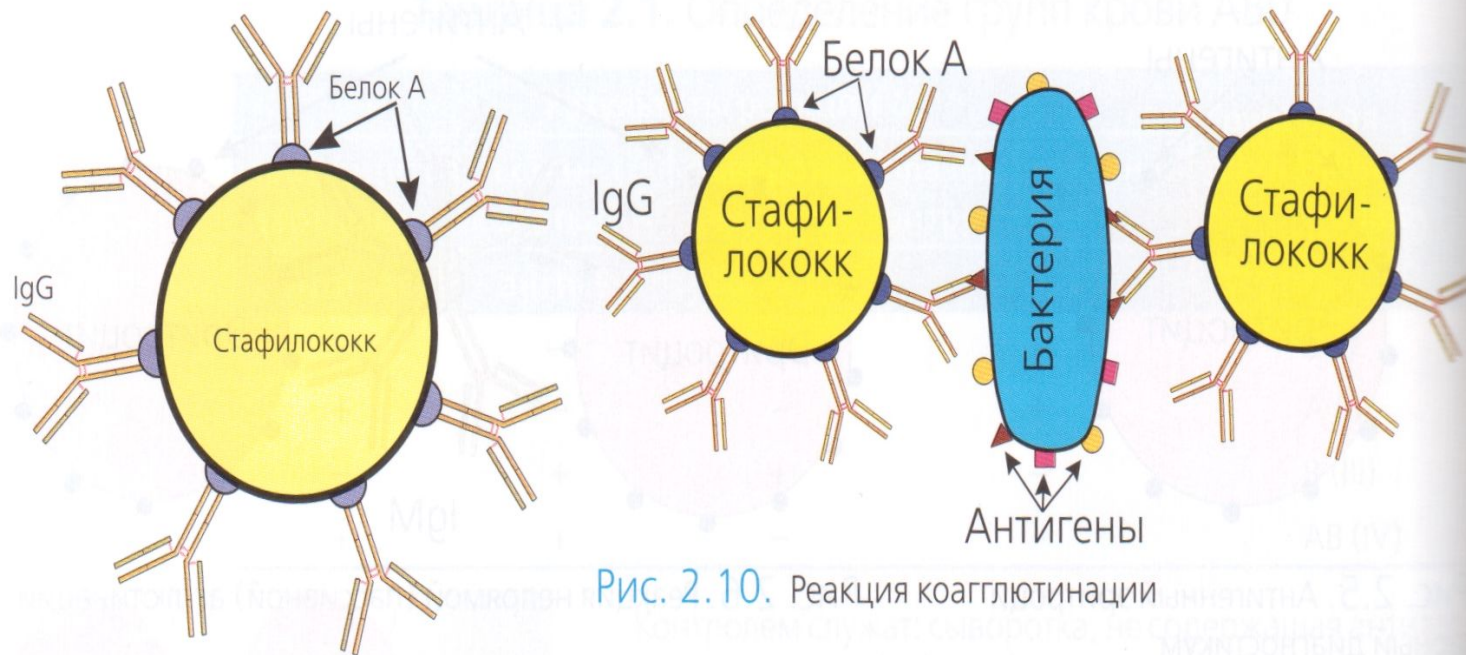
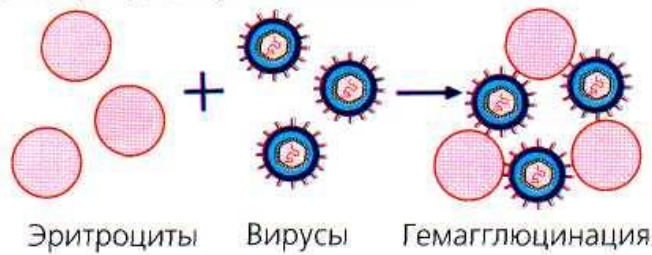
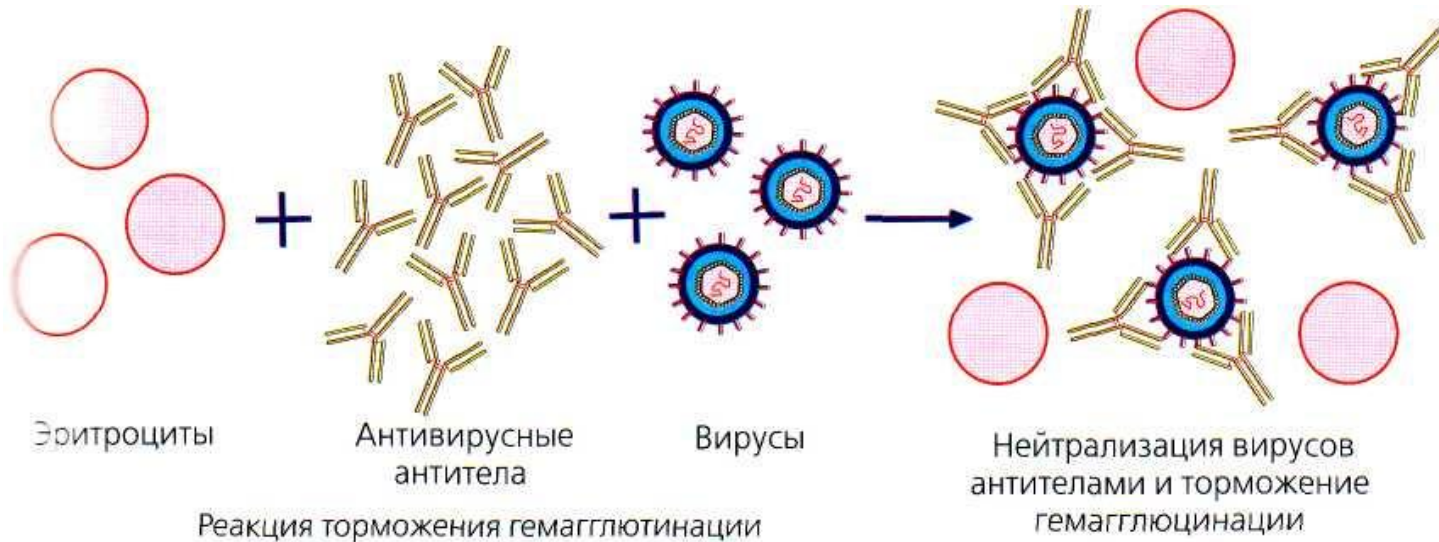


Рис. 2.10. Реакция коаггутинации

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)



Гемагглютинины вирусов склеивают эритроциты. Это свойство используют в реакции гемагглютинации для индикации и титрования вирусов, что необходимо для последующей постановки РТГА.

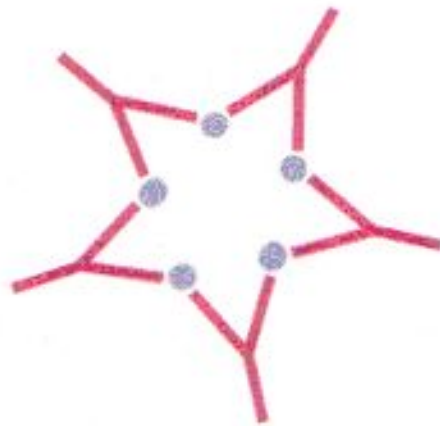


Реакция торможения гемагглютинации основана на блокаде антигенов вирусов (гликопротеиновых «шипов» - гемагглютининов) антителами иммунной сыворотки, в результате чего вирусы теряют свойство агглютинировать эритроциты

- **РТГА** применяют для диагностики многих вирусных инфекций, возбудители которых (вирусы гриппа, кори, краснухи, клещевого энцефалита) могут агглютинировать эритроциты различных животных.

Реакции преципитации

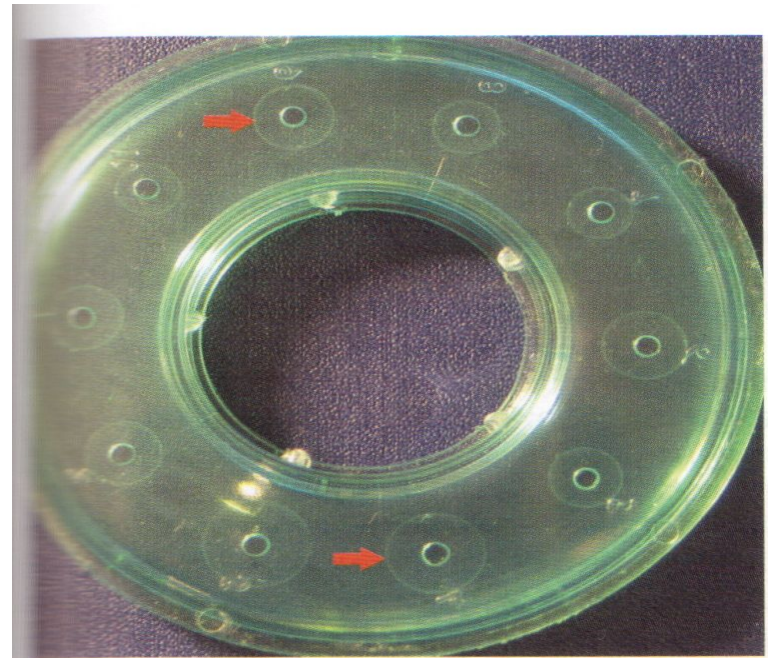
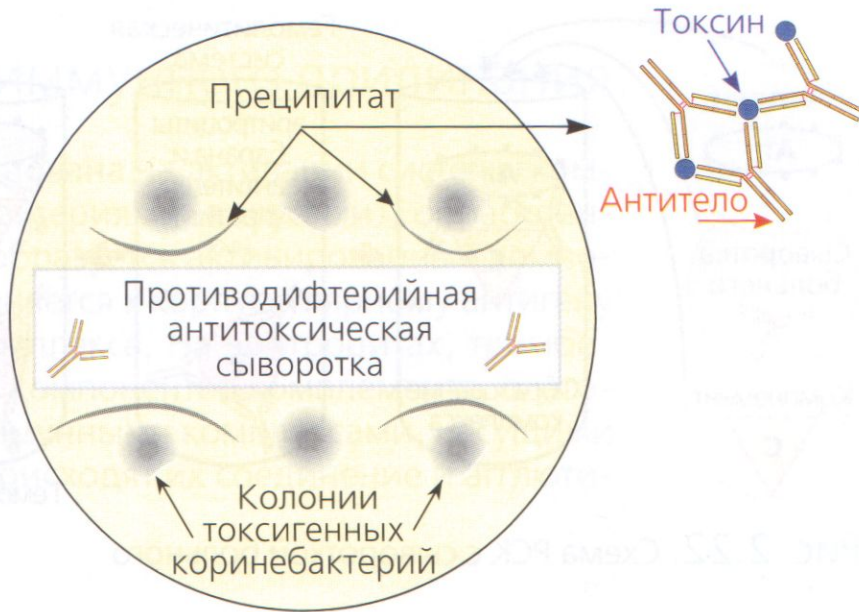
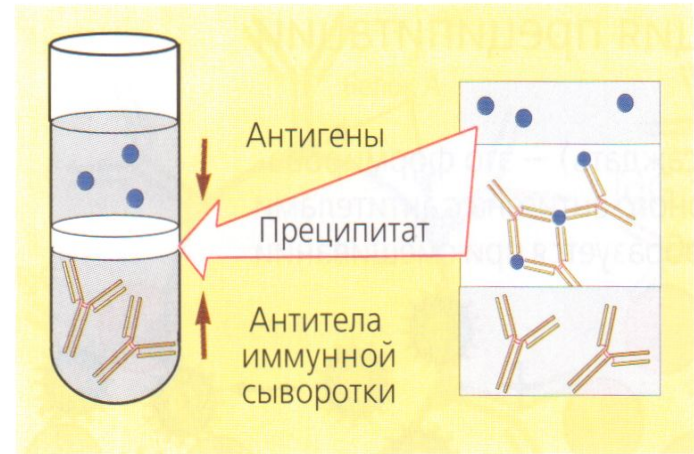
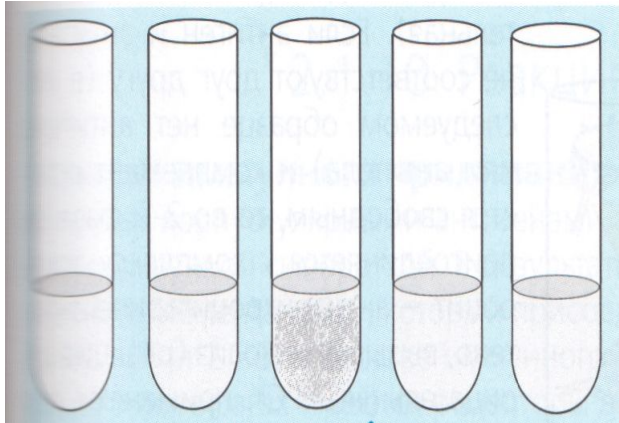
- (от лат. *praecipito* - осаждать) - это формирование и осаждение комплекса растворимого молекулярного антигена с антителами в виде помутнения, называемого преципитатом.
- Антиген – растворимый (молекулы)
- Комплекс АГ-АТ образуется при эквивалентном соотношении эпито

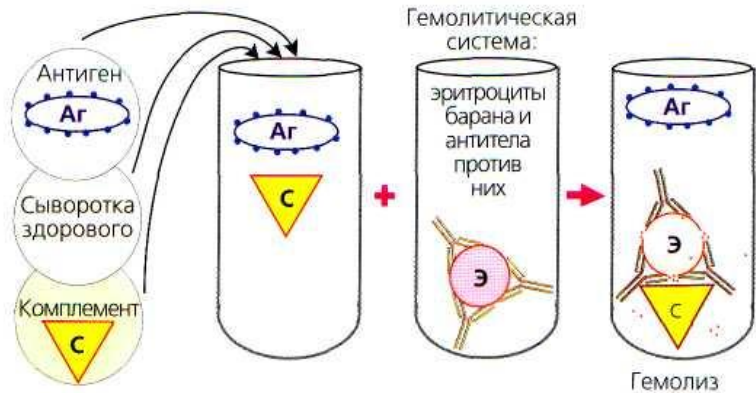
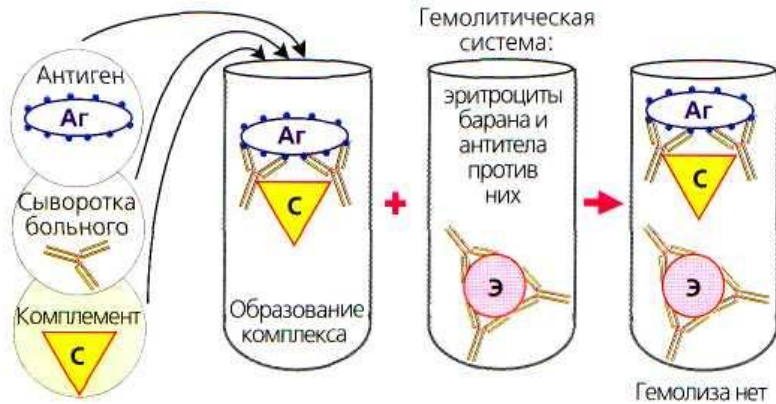


Образование
иммунных
комплексов
с молекулами
антигенов

Преципитация

Реакции преципитации





РСК применяют для диагностики многих инфекционных болезней, в частности сифилиса (реакция Вассермана).

Реакция связывания комплемента

заключается в том, что при соответствии друг другу антигенов и антител они образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (C), т. е. происходит связывание комплемента комплексом антиген-антитело.

Если же комплекс антиген-антитело не образуется, то комплемент остается свободным

РСК проводят в две фазы:

1-я фаза - инкубация смеси, содержащей антиген + антитело + комплемент;

2-я фаза (индикаторная) - выявление в смеси свободного комплемента путем добавления к ней гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к ним.

Реакции с участием меченых антигенов или антител

Реакция иммунофлуоресценции

- основана на том, что антитела иммунной сыворотки метят флюорохромами.
- Комплекс АГ–АТ обнаруживают при флюоресцентной микроскопии

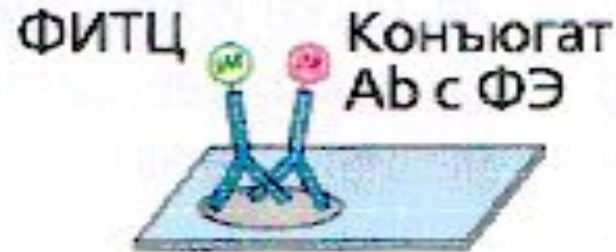


1. Прямая иммуно-флуоресценция

Первичное антитело (мыши против человека)



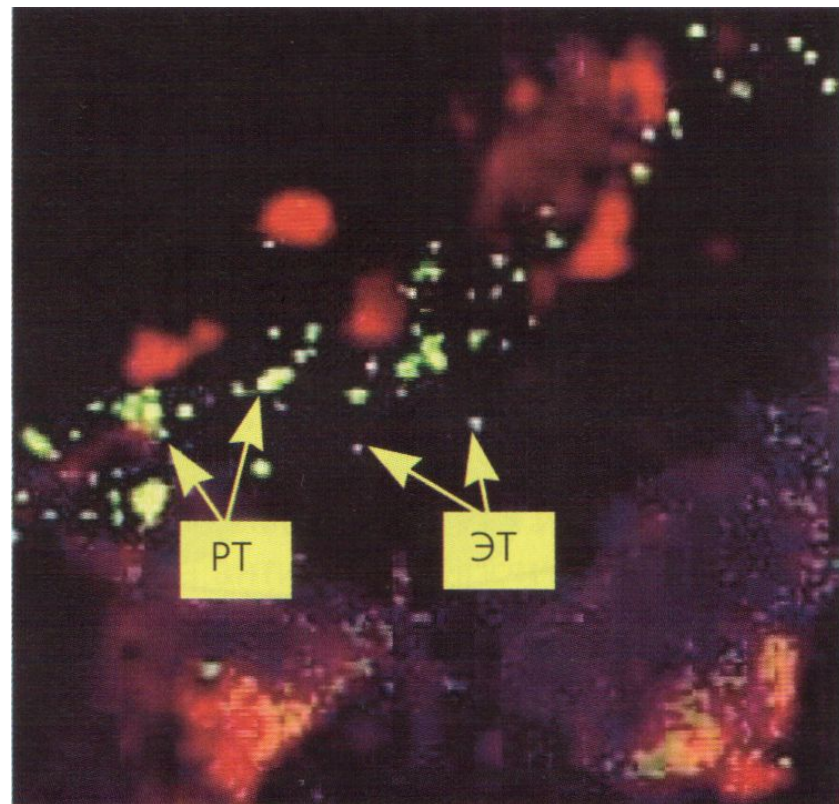
3. Непрямая иммунофлуоресценция



2. Двойная флуоресценция



РИФ (МФА)



Реакции с участием меченых антигенов или антител

Радиоиммунный анализ (РИА)

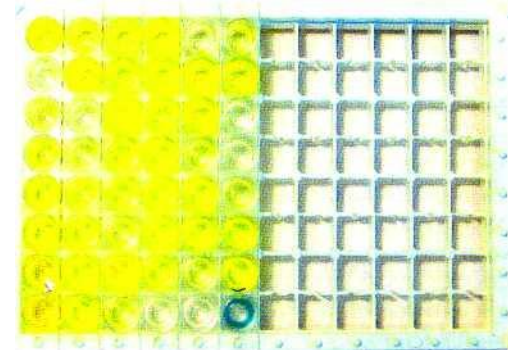
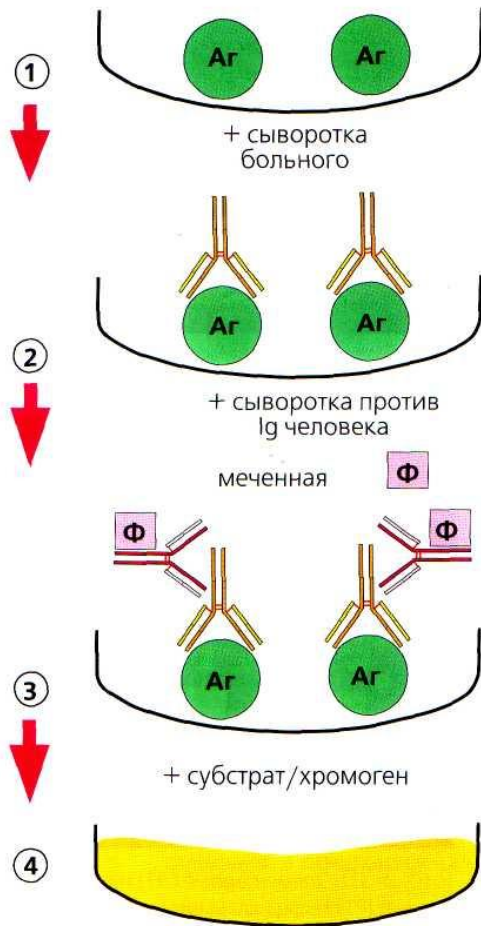
- основан на использовании антител, меченных радиоактивным йодом (^{125}I), водородом (^3H), (^{14}C), (^{51}Cr)
- Измеряется радиоактивность образовавшегося комплекса АГ–АТ с помощью радиометров – счетчиков бета- и гамма-излучений

Реакции с участием меченых антигенов или антител

Иммуноферментный анализ (ИФА)

- Используется конъюгат: антитела, связанные с ферментом (пероксидаза, щелочная фосфатаза), который при положительном результате включается в комплекс АГ – АТ
- при добавлении соответствующего субстрата происходит изменение окраски
- учитывается с помощью спектрофотометра (измеряется оптическая плотность опытных лунок, по сравнению с контрольными (качественная ИФА) или стандартными (количественная ИФА))

Иммуноферментный анализ (ИФА)



Прямой метод

1. Сыворотку, содержащую смесь АТ, инкубируют с Аг, фиксированным на твёрдом субстрате



2. АТ, не связывающие Аг, удаляют многократным промыванием



3. Вносят меченную ферментом антисыворотку к АТ, связавшим Аг



4. Определяют количество фермента-маркера, связавшегося с АТ

MedUniver.com все по
медицине

Лунка пластиковой
микрочашки

Аг

Непрямой метод

АТ-положительная сыворотка



1. Специфические АТ в исследуемой сыворотке связывают Аг, фиксированный на твёрдом субстрате



2. Специфические АТ, меченные ферментом, не взаимодействуют со связанным Аг — содержание маркера в субстрате низкое

АТ-отрицательная сыворотка



1. Неспецифические АТ в исследуемой сыворотке не связывают Аг, фиксированный на твёрдом субстрате



2. Специфические АТ, меченные ферментом, взаимодействуют с фиксированным Аг — содержание маркера высокое

ИФА применяют для диагностики вирусных, бактериальных и паразитарных болезней, в частности для диагностики ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С и др., а также для определения гормонов, ферментов, цитокинов, иммуноглобулинов, лекарственных препаратов и других биологически активных веществ, содержащихся в исследуемом материале в малых концентрациях (10^{10} - 10^{12} г/л).

Иммуноблоттинг (или вестернблоттинг)

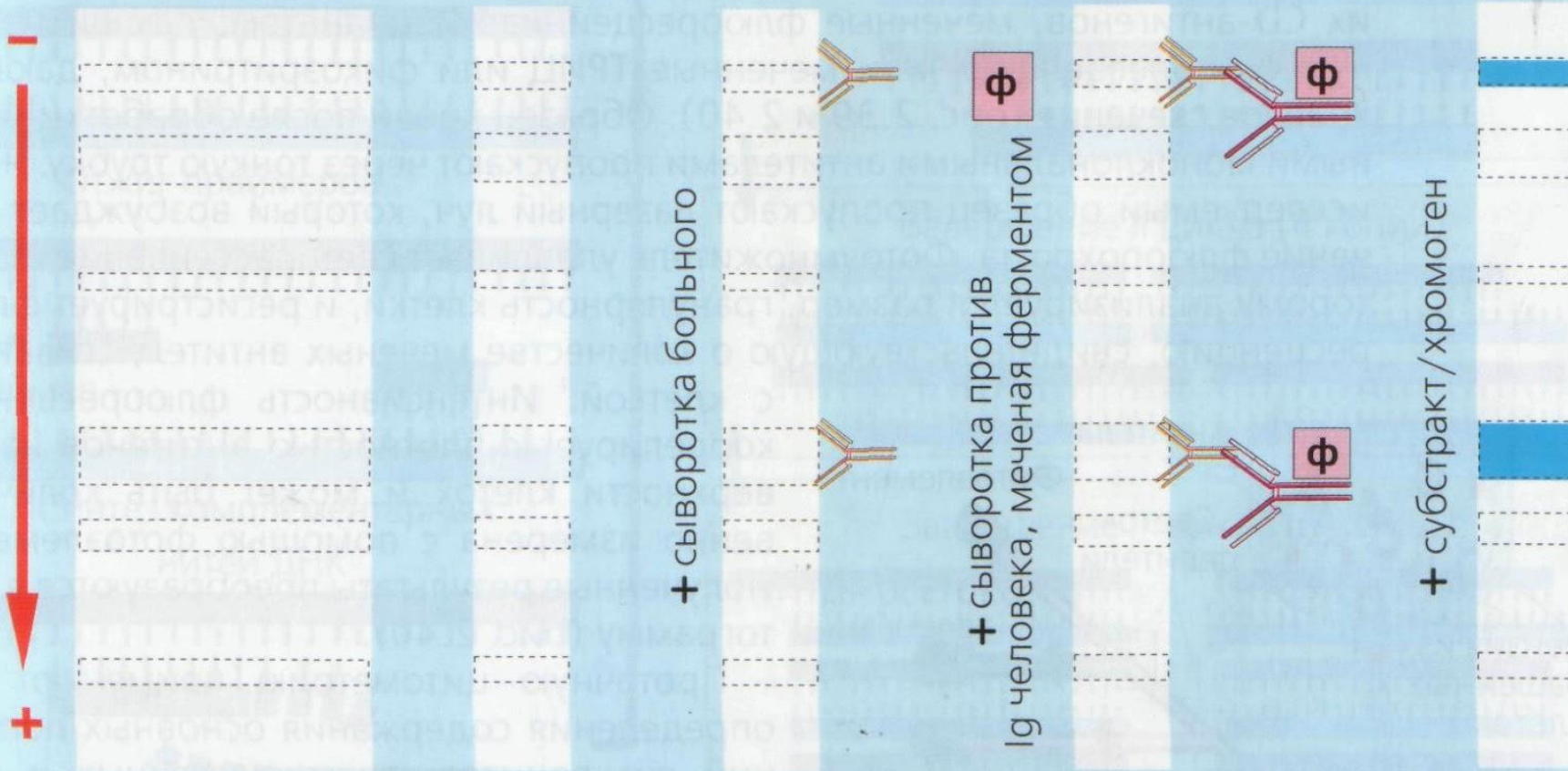
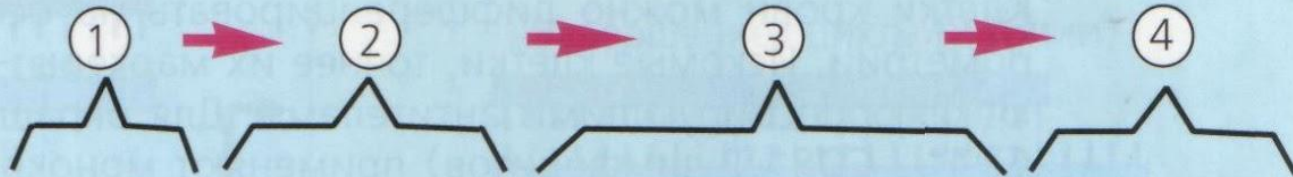
- – **высококочувствительный метод выявления белков, основанный на сочетании электрофореза и ИФА. ИБ используют как диагностический метод при ВИЧ-инфекции и др.**

Антигены возбудителя разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем переносят их (блоттинг- от англ. blot – пятно) из геля на активированную бумагу (1) или нитроцеллюлозную мембрану и проявляют с помощью ИФА.

Фирмы выпускают такие полоски с «блота́ми» антигенов*. На эти полоски (стрипы) наносят сыворотку больного (2). Затем, после инкубации, отмывают от несвязавшихся антител больного и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченную ферментом (3).

Образовавшийся на полоске комплекс (антиген + антитело больного + антитело против Ig человека) выявляют добавлением хромогенного субстрата (4), изменяющего окраску под воздействием фермента.

Электрофорез
в геле
антигенов
возбудителя



перенос антигенов
на бумагу

Иммуноблоттинг

*** Метод переноса пятен ДНК первоначально разработал в 1975 г. Саузерн (фамилия Southern в переводе означает «южный»); метод получил название саузернблоттинг (южный перенос). Метод переноса фрагментов РНК называли нозернблоттинг (северный перенос), а метод переноса фрагментов белка – вестернблоттинг (западный перенос).**

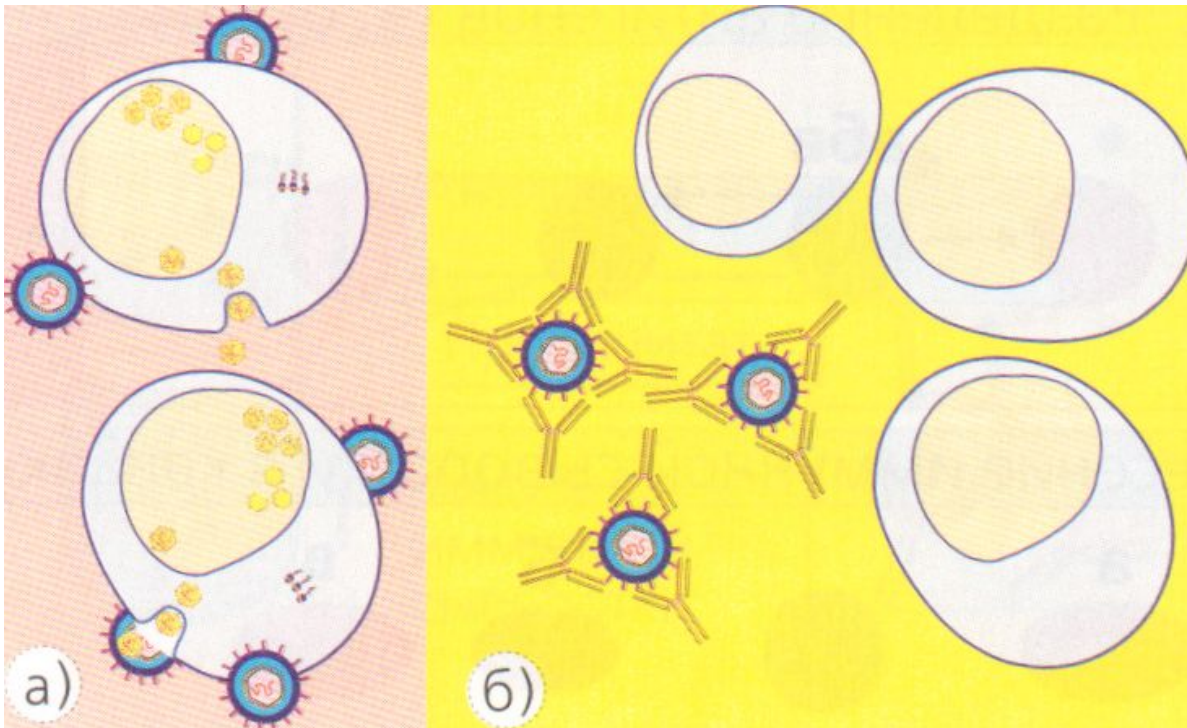
Реакции нейтрализации

1. Реакция нейтрализации токсина

- для определения типа токсина возбудителя
- смесь токсина (исследуемого материала) и антитоксической сыворотки соинкубируют
- вводят белым мышам
- мыши не погибают, если токсин (АГ) и АТ были специфичны друг другу

Реакции нейтрализации

2. Реакции нейтрализации вирусов



ЦПД(+)

ЦПД (-)

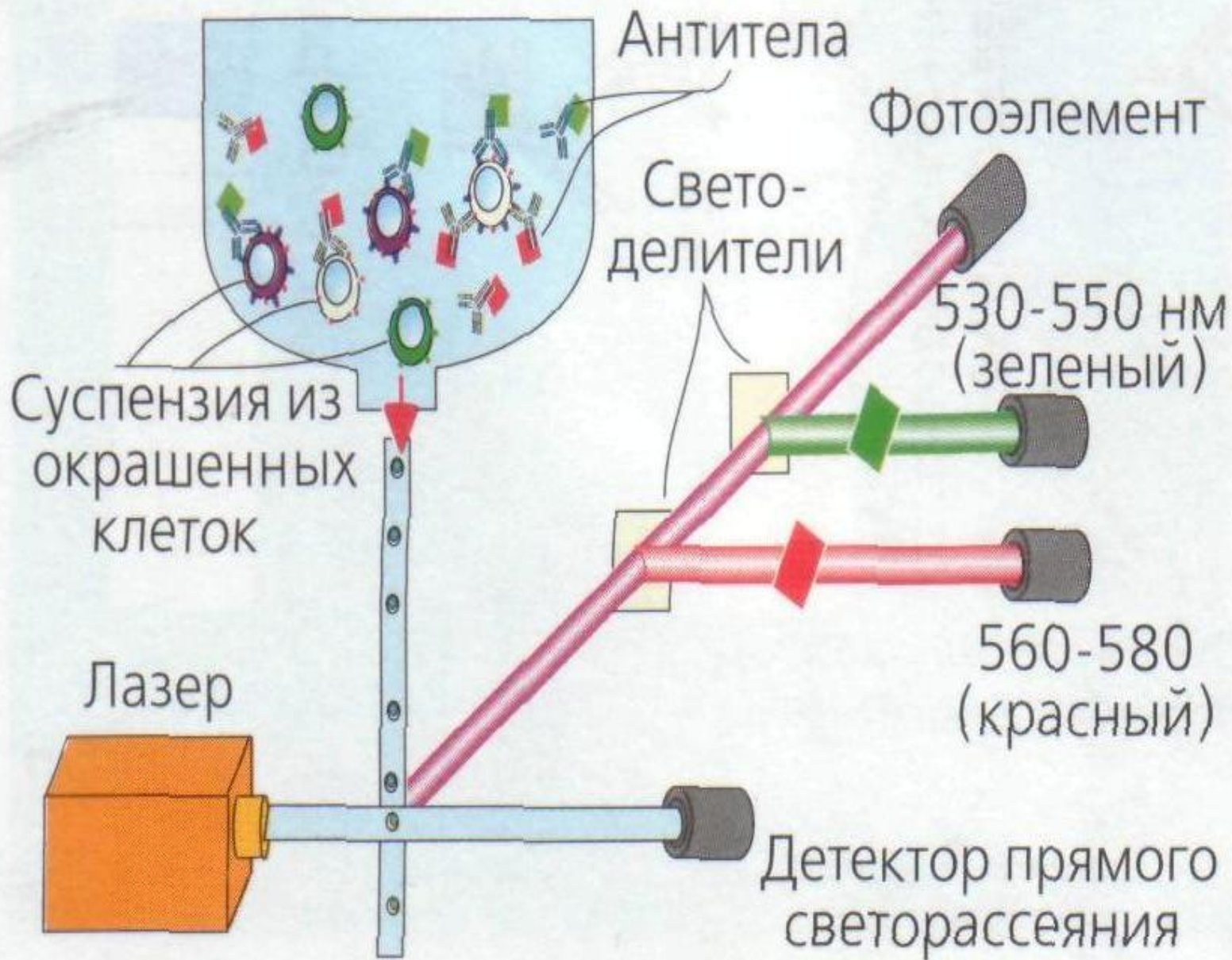
Проточная цитометрия –
технология, позволяющая
измерять физические и/или
химические характеристики
клеток (частиц)

Проточная цитометрия

- **Клетки крови можно дифференцировать на основе лазерной цитофлуорометрии. Искомые клетки, точнее их маркеры – CD-антигены, окрашивают флуоресцирующими антителами. Для окрашивания клеток (например, CD4+, CD8+-Т-лимфоцитов) применяют моноклональные антитела против их CD-антигенов, меченные флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТС), дающим зеленую флуоресценцию, или фикоэритрином, дающим красное свечение.**

Образец крови после обработки мечеными моноклональными антителами пропускают через тонкую трубку. Через исследуемый образец пропускают лазерный луч, который возбуждает свечение флюорохрома.

Фотоумножитель улавливает светорассеивание, по которому анализируется размер, гранулярность клетки, и регистрирует флюоресценцию, свидетельствующую о количестве меченых антител, связанных с клеткой. Интенсивность флюоресценции коррелирует с плотностью антигенов на поверхности клеток и может быть количественно измерена с помощью фотоэлемента. Полученные результаты преобразуются в гистограмму.

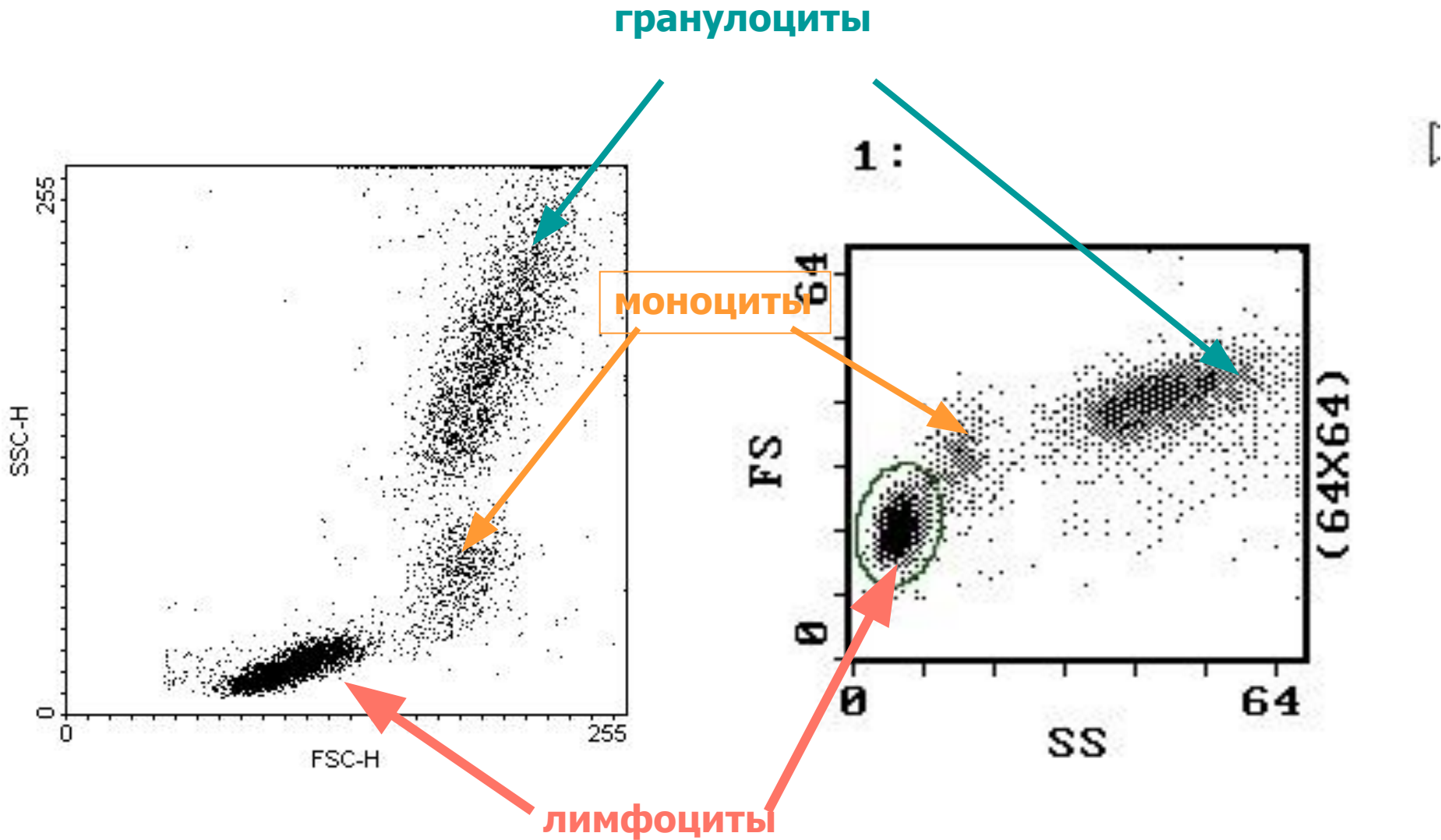


. Принцип проточной цитометрии

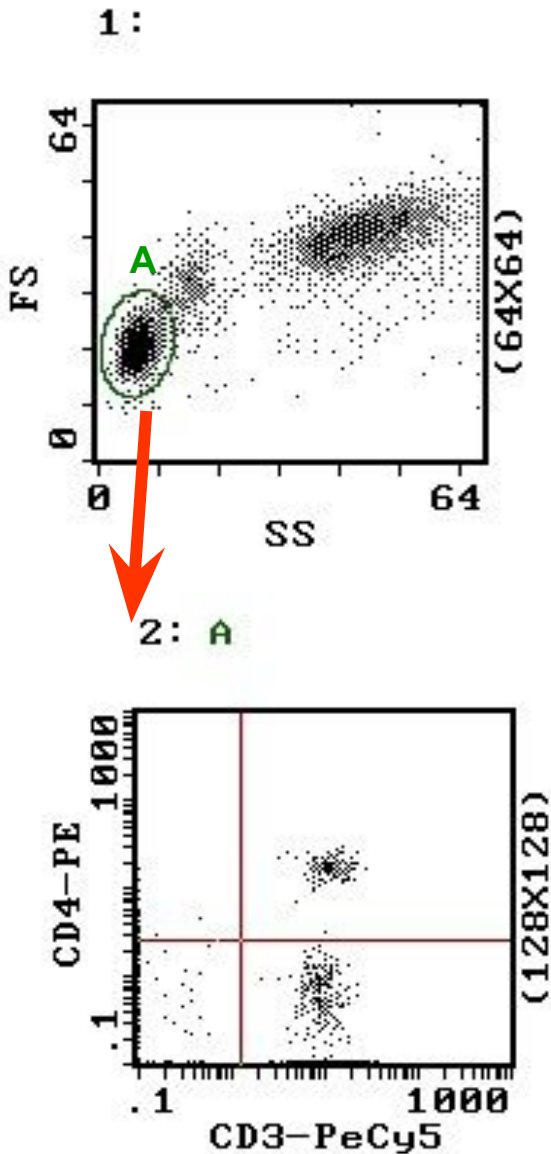
Светорассеяние

FACSCalibur

Epics XL



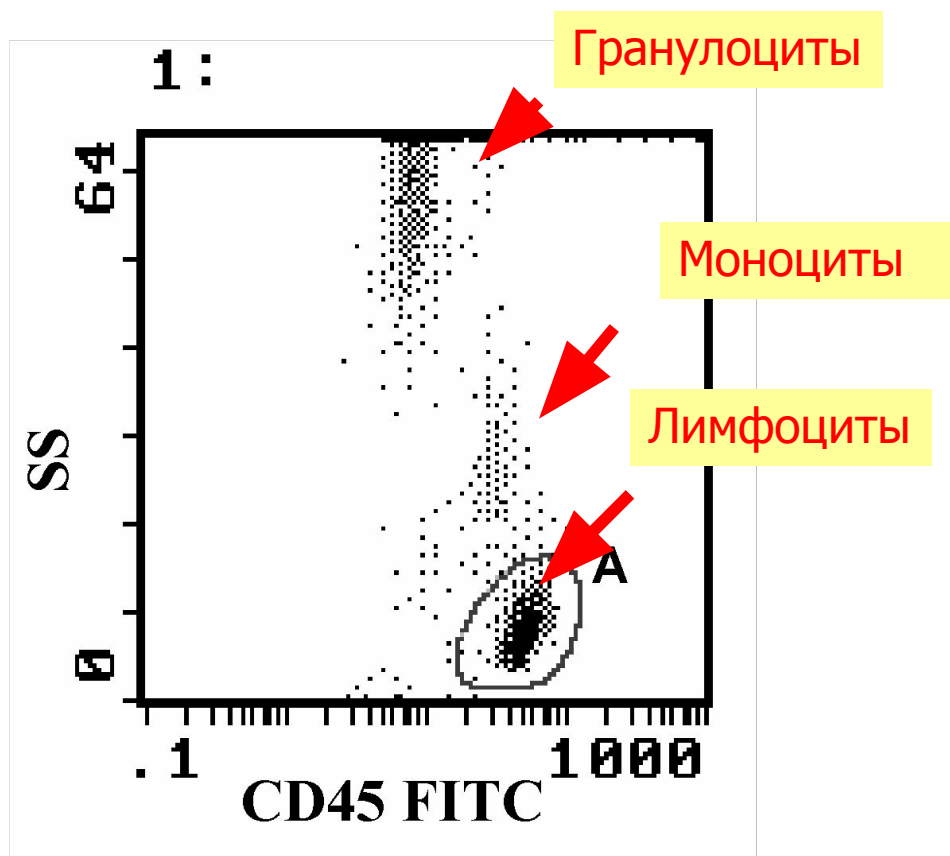
Гейтирование



- Гейт – графическая граница, которая может быть установлена по любому параметру (параметрам)
Таким образом можно осуществлять анализ только тех данных, которые попадают в гейт

Гейтирование по CD45 сочетания с боковым светорассеянием

гетерогенный гейтинг



- Лимфоциты ярко окрашиваются по CD45 имеют слабые свойства бокового светорассеяния
- Моноциты окрашиваются по CD45 слабее лимфоцитов и имеют более сильное боковое светорассеяние
- Гранулоциты по сравнению с моноцитами слабее окрашиваются по CD45 и имеют более сильное боковое светорассеяние

Проточная цитометрия

- Иммунофенотипирование – определение CD-маркеров лимфоцитов
 - диагностика иммунодефицитов
 - диагностика лейкозов
- Определение функциональной активности лимфоцитов
- Определение внутриклеточных цитокинов
- Изучение апоптоза (CD 95)

Нейтрофил



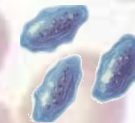
Эозинофил



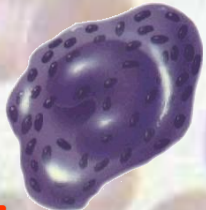
Моноцит



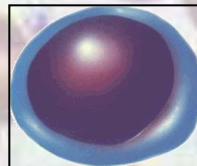
Тромбоциты



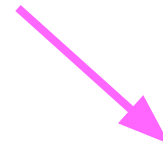
Базофил



Лимфоцит



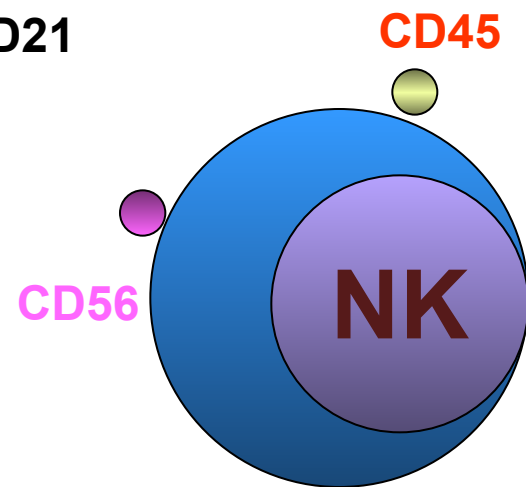
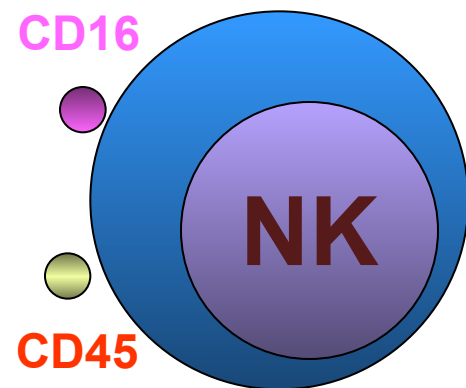
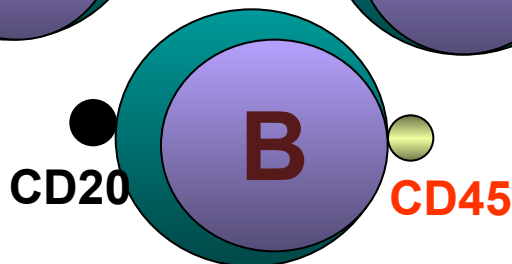
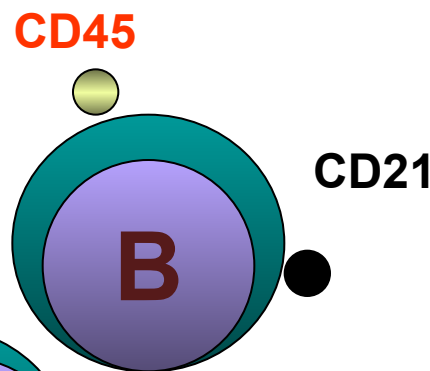
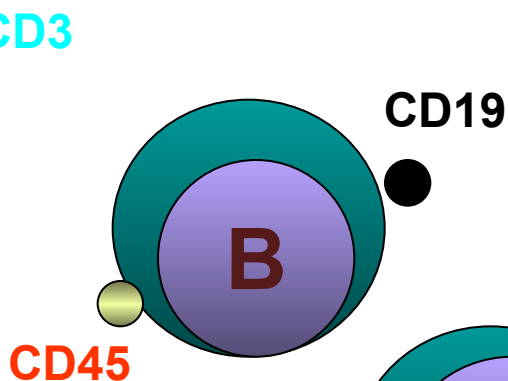
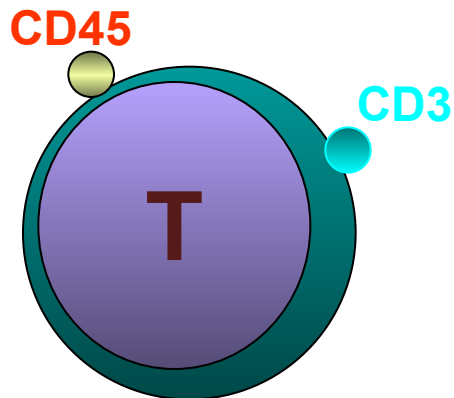
«Три» типа лимфоцитов



НК-клетки
(натуральные киллеры)

Т-лимфоциты

В-лимфоциты



CD-АНТИГЕНЫ

- CD – Cell Differentiation Antigens or Cluster Definition;
- Система групповых мембранных антигенов (более 300);
- Гликопротеины клеточных мембран;
- Экспрессия CD-маркеров зависит от типа клетки, стадии её дифференцировки и функционального состояния
- Типирование CD-маркеров проводится с использованием моноклональных антител (проточная цитофлюорометрия, РИФ, цитотоксический тест)

CD-АНТИГЕНЫ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК

CD-маркер	Клетка
CD45	все лейкоциты
CD3	T-лимфоциты
CD4	T-хелперы
CD8	T-киллеры
CD14	макрофаги/моноциты
CD16, CD56	NK-клетки
CD19-22	B-лимфоциты
CD34	стволовые клетки

Лейкоциты (WBC)

Гранулоциты



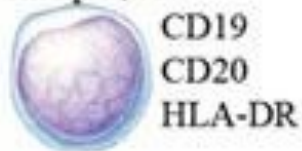
Моноциты



Лимфоциты



В-лимфоциты



Т-лимфоциты



НК-клетки



Т-хелперы

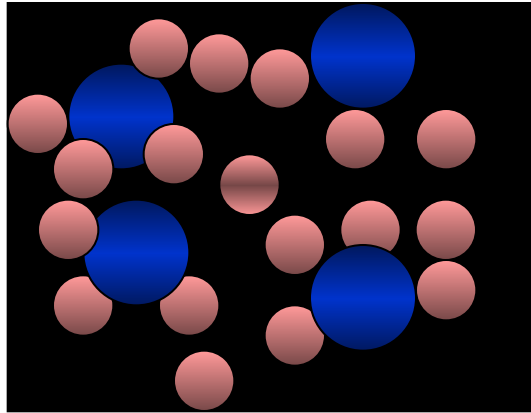


цитотоксические Т-лимфоциты



ФЕНОТИПИРОВАНИЕ

ЛИМФОЦИТОВ



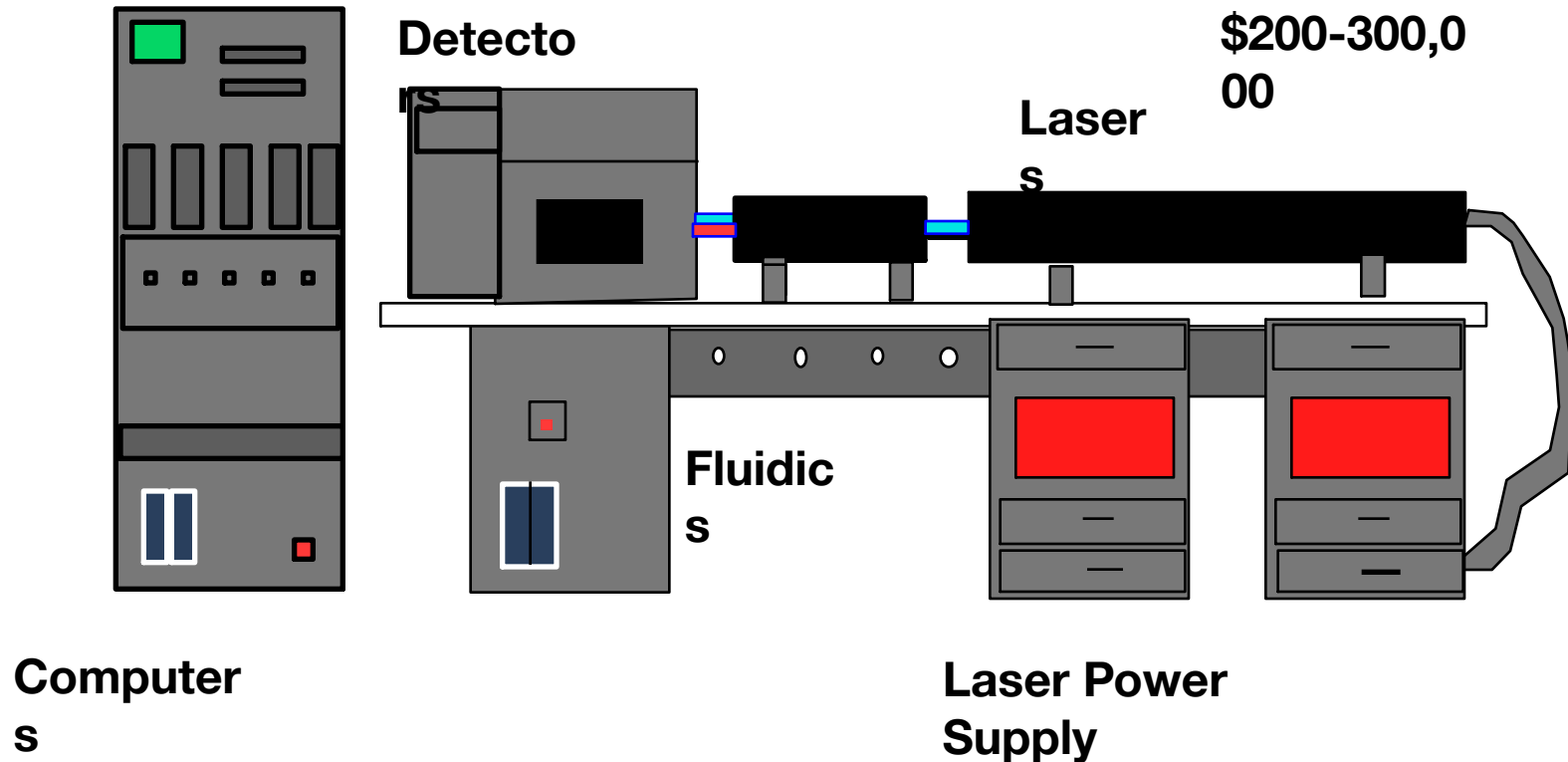
До 1986 года -
розеткообразование

1986 - октябрь 1987 -
флуоресцентная микроскопия

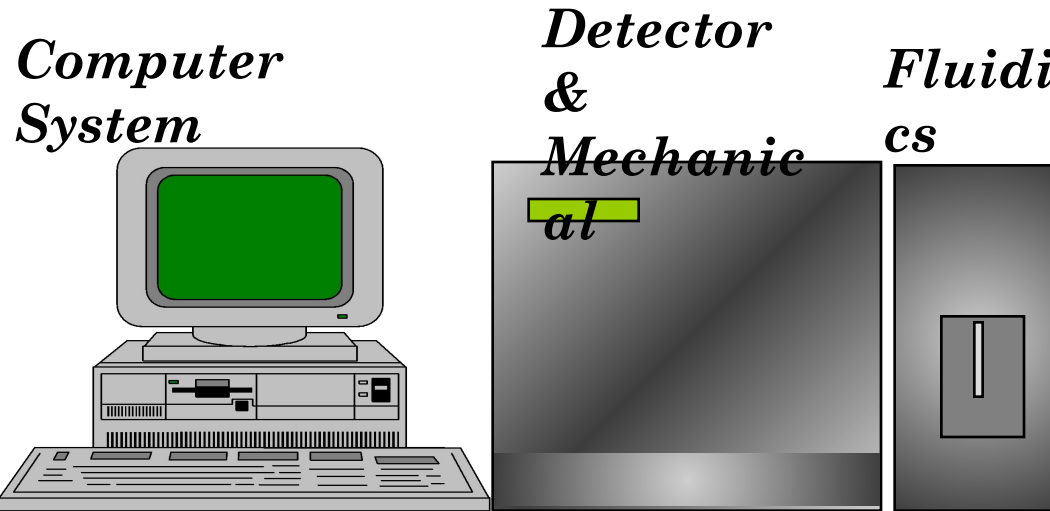
С октября 1987 - проточная
цитометрия



Typical Research Cytometer (Coulter 753) (1980s)



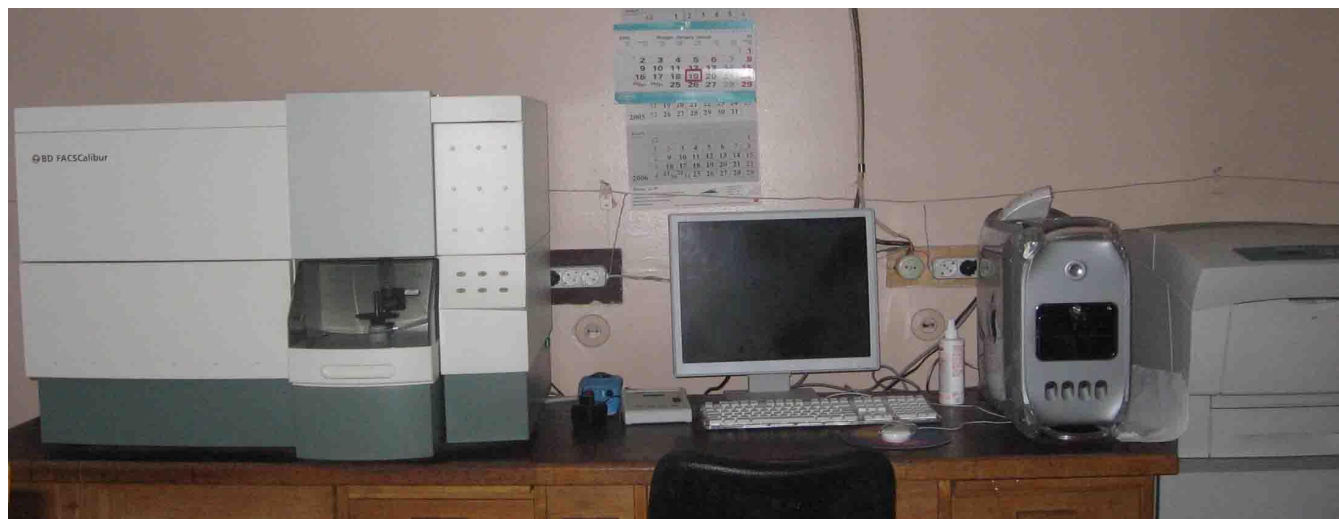
Typical Clinical Cytometer



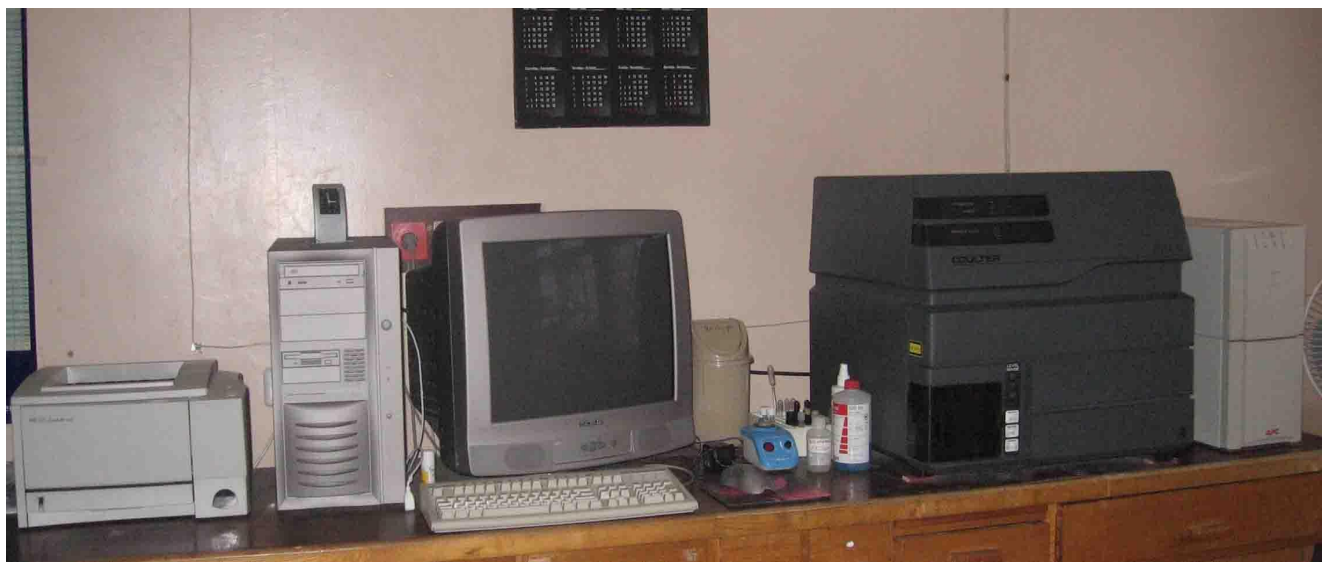
\$90-120,000

Проточные цитометры

FACSCalibur
“Becton Dickinson”



EPICS XL
“BECMAN
COULTER”



Компактные проточные цитометры



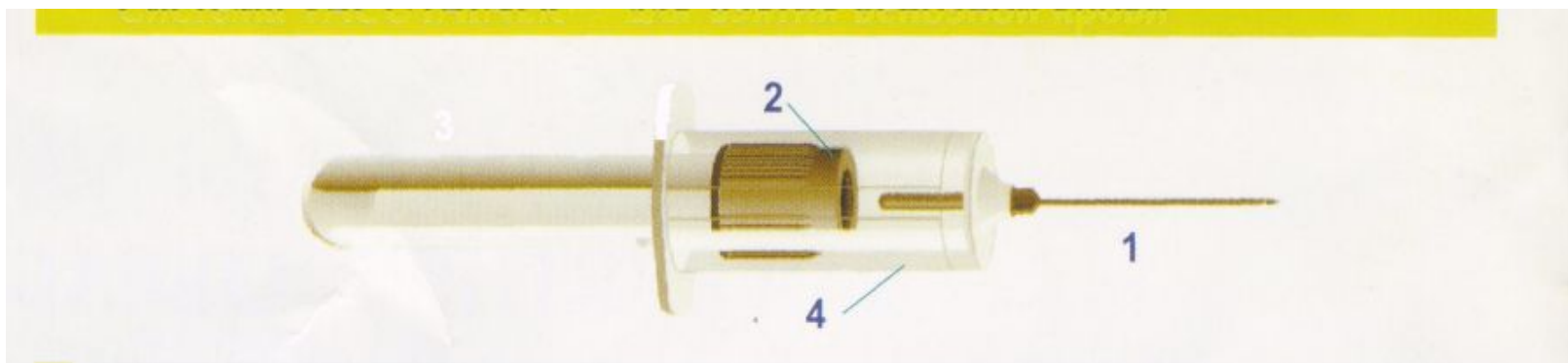
Этапы определения количества CD-маркеров лимфоцитов



- 1-преаналитический этап
 - -подготовка пациента
 - -влияние различных факторов
 - -выбор антикоагулянтов
 - -процедура забора крови
 - -хранение образцов
 - -транспортировка образцов
- 2-подготовка пробы для фенотипирования
- 3-подготовка цитометра для работы
- 4-выполнение исследования
- 5-выдача результата
- 6-внутренний и внешний контроль качества



СИСТЕМЫ VACUTAINER™ ДЛЯ ВЗЯТИЯ ПРОБ



Функциональные тесты.

- **1. Спонтанная реакция бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ) – способность лимфоцитов к трансформации без стимуляции (в норме – до 10%), выполняется для оценки функциональной активности Т-лимфоцитов.**

***2. Стимулированная
бластная трансформация с
митогенами
фитогемагглютинином (ФГА)
или конканавалином (Кон А)
характеризует функциональную
способность Т-лимфоцитов к
трансформации и размножению
под воздействием антигенов,
аллергенов и митогенов.***

О функциональной активности В-лимфоцитов судят по бластной трансформации в ответ на стимуляцию митогеном лаканоса и другими липополисахаридными митогенами, а на стимуляцию митогеном латекса – о кооперативных процессах между Т- и В-лимфоцитами.

Пролиферативный ответ лимфоцитов на антигены дает представление о выраженности специфической сенсibilизации организма.

В норме – 40-75%.

Заболевания и состояния, при которых изменяется спонтанная бластная трансформация лимфоцитов

Снижения показателя

**Онкологические заболевания.
Вторичные иммунодефицитные состояния.
Первичные иммунодефицитные состояния.
Тяжелые вирусные инфекции.
Тяжелые ожоги, травмы.
Лечение цитостатиками и иммунодепрессантами, облучение ионизирующей радиацией.
Прием кортикостероидов.**

Повышение показателя

**Гиперактивность иммунной системы при аллергических и аутоиммунных заболеваниях.
Активация антитрансплантационного иммунитета.
Криз отторжения донорских органов.
Острый период первичной инфекции.
Иммунный ответ на тимусзависимые антигены.**

Фагоцитарная активность нейтрофилов

- Изучение показателей фагоцитоза имеет значение в комплексном анализе и диагностике иммунодефицитных состояний: часто рецидивирующих гнойно-воспалительных процессов, длительно не заживающих ран, склонности к послеоперационным осложнениям.**

В связи с тем, что фагоциты участвует в элиминации иммунных комплексов и активность фагоцитоза тесно связана с активностью компонентов комплемента, а именно С3, концентрацией IgG-антител, наличием других опсонизирующих факторов, исследование активности фагоцитоза играет важную роль в диагностике, оценки активности и эффективности терапии при ревматических заболеваниях, коллагенозах

Наиболее информативными для оценки активности фагоцитоза считают:

- ***Фагоцитарное число (ФЧ)*** – среднее количество микробных или дрожжевых частиц, поглощенных одним нейтрофилом крови. Характеризует поглотительную способность нейтрофилов. Норма – 5-10 микробных частиц, 1-3 дрожжевых.
- ***Фагоцитарная показатель (ФП)*** – процент нейтрофилов, имеющих поглощенные частицы от общего числа. Норма для взрослых – 65-95% (микробные ч.), 65-85% (дрожжи)
- ***Индекс завершенности фагоцитоза*** – переваривающая способность фагоцитов. Норма - больше или равно 1.0

Заболевания и состояния, при которых изменяется фагоцитарная активность нейтрофилов

<i>Повышение показателя</i>	<i>Снижение показателя</i>
Антигенное раздражение вследствие бактериального воспаления (продромальный период, период острого проявления инфекции) при нормальной активности фагоцитоза Лейкоцитоз Аллергия Аутоиммунные заболевания Усиление антителозависимой цитотоксичности и реакции на донорский трансплантат	Хронические воспалительные заболевания бактериальной и вирусной природы Врожденные дефекты фагоцитарной системы, с. Чедиака-Хигаси, б. Дауна, СКВ, коллагенозы, болезни иммунных комплексов, недостаток иммуноглобулинов, компонента Лечение цитостатиками и иммунодепрессантами, облучение ионизирующей радиацией. Первичные и вторичные иммунодефициты Новообразования Тяжелые ожоги, травмы, стресс Кишечные и почечные синдромы потери белка

НСТ-тест в крови

- ***Спонтанный тест с НСТ (нитросиний тетразолий)*** позволяет оценить степень антигенной раздраженности неактивированных *in vitro* гранулоцитов крови. Он характеризует степень активации внутриклеточных антибактериальных систем. Принцип метода основан на восстановлении поглощенного фагоцитом растворимого красителя нитросинего тетразолия в нерастворимый диформаза́н под влиянием супероксиданиона, образующегося в НАДФ-Н-оксидазной реакции.

Повышение спонтанного теста с НСТ

- отмечается при антигенном раздражении вследствие бактериального воспаления (продромальный период, период острого проявления инфекции при нормальной активности фагоцитоза), при хроническом гранулематозе, лейкоцитозе, усилении антителозависимой цитотоксичности фагоцитов, аутоиммунных заболеваниях, аллергии.

Снижение спонтанного теста с НСТ

- характерно для хронизации воспалительного процесса, врожденных дефектов фагоцитарной системы, вторичных и первичных иммунодефицитов, СПИДа, злокачественных новообразований, тяжелых ожогов, травм, стрессов, недостаточности питания, лечения цитостатиками и иммунодепрессантами, облучения ионизирующей радиацией.
- В норме у взрослых число НСТ-положительных нейтрофилов в спонтанном тесте – до 10%.

Активированный тест с НСТ в крови

- Позволяет оценить функциональный резерв кислородзависимого механизма бактерицидности фагоцитов. При сохраненной внутриклеточной антибактериальной активности в фагоцитах резко возрастает число формазанположительных нейтрофилов после их стимуляции латексом или пирогеналом. Снижение показателей активированного НСТ-теста нейтрофилов ниже 40% и моноцитов ниже 87% свидетельствует о недостаточности фагоцитоза.
- В норме у взрослых число НСТ-положительных нейтрофилов в активированном тесте – 40 - 80%.

Определение уровня ЦИК в сыворотке.

- Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) – это комплексы, состоящие из антигена, антител и связанных с ними компонентов комплемента С3, С4, С1q. В норме иммунные комплексы, образовавшиеся в кровотоке, фагоцитируются и разрушаются как фагоцитами, так и печенью. Однако при увеличении их размера (при избытке антигена и наличии в их структуре IgM, С1q-компонента комплемента) комплексы могут откладываться в периваскулярном пространстве и корковом слое почек, вызывая активацию комплемента и воспалительные процессы.

Патологические реакции на иммунные комплексы могут быть обусловлены повышением скорости их образования над скоростью элиминации, дефицитом одного или нескольких компонентов комплемента или функциональными дефектами фагоцитарной системы. Определение уровня иммунных комплексов в сыворотке крови имеет важное значение в диагностике острых воспалительных процессов и аллергических реакций III типа, при которых уровень ЦИК повышается, а также в оценке эффективности проводимого лечения.

Принцип метода определения уровня ЦИК в сыворотке основан на изменении величины светового рассеивания раствора полиэтиленгликоля вследствие осаждения им ЦИК из сыворотки крови. Изменение плотности раствора регистрируется на спектрофотометре при длине волны 280 нм.

Различные концентрации ПЭГ вызывают преципитацию различных по молекулярной массе и размерам иммунных комплексов. Низкие концентрации ПЭГ осаждают комплексы крупных размеров, высокие вызывают преципитацию низкомолекулярных соединений

Нормальные величины ЦИК: с 3,5% р-ром ПЭГ - 0 – 40; с 5% р-ром – 30 – 80; с 7% р-ром – 80 – 300 ед. опт. плотности.

Основным принципом оценки результатов комплексного исследования иммунного статуса у больного является количественное и функциональное определение всех его звеньев – гуморального, клеточного и неспецифической резистентности – и их сравнение с нормальными величинами. Используя методы клинической иммунологии, необходимо выявить у больного уровень нарушений, а затем осуществлять контроль за восстановлением иммунного статуса организма в процессе лечения.

Спасибо за внимание!