

АО «Медицинский Университет Астана»

**ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
КРОВИ: ИФА, ИММУНОБЛОТТИНГ, РИФ.**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ
ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ ANCA, ANA,
ENA, LE КЛЕТКИ**

Циркулирующие иммунные комплексы

- Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) в крови - показатель развития различных воспалительных процессов в организме и показатель активности течения аутоиммунных заболеваний. Основные показания к применению: аутоиммунные заболевания, ревматизм, коллагенозы, вирусные бактериальные и грибковые заболевания, гломерулонефрит, артриты, аллергия.

- ◎ ЦИК образуются и циркулируют в кровяном русле в ответ на введение чужеродного агента (антигена). Они представляют собой комплексы, состоящие из антител, антигена и компонентов комплемента. Образование ЦИК - физиологический механизм защиты организма, приводящий к быстрому удалению эндогенных и экзогенных антигенов (вирусы, паразиты, бактерии, микроорганизмы, антигены растений, пыльца, пищевые продукты) через ретикуло-эндотелиальную систему.

- Образующиеся иммунные комплексы в норме захватываются фагоцитами и разрушаются ими. Метаболизм ЦИК протекает также и в печени. Далее происходит их удаление из организма. При инфицировании, аллергии, болезнях иммунных комплексов происходит повышенное образование ЦИК, и, в ряде случаев, откладывание этих комплексов в корковом слое почек с развитием воспаления.

● Вследствие избыточного накопления ЦИК, последующей активации комплемента и лизосомальных ферментов в различных тканях происходят воспалительные процессы, сопровождающиеся поражением органов. Высокое содержание ЦИК обнаруживается при онкологических заболеваниях.

АНЦА

- ⦿ Антинейтрофильные цитоплазматические антитела, АНЦА (Антитела к цитоплазме нейтрофилов с указанием типа свечения - цитоплазматический или перинуклеарный, рАНСА и сАНСА)

- Чувствительность тестирования на наличие сАНСА и рАНСА непрямо́й иммунофлюоресценцией при
 - гранулематозе Вегенера – 85%,
 - микроскопическом полиангиите – 81%,
 - идиопатическом быстро прогрессирующем гломерулонефрите – 81%,
 - классическом узелковом полиартериите – 40%,
- Вероятность ложноположительных результатов для пациентов с другими заболеваниями составляет около 24%, для здоровых людей – 6%.

Антиядерные антитела (ANA), антитела класса IgG к экстрагированным ядерным антигенам (ENA)

- Антитела против различных ядерных антигенов являются весьма важным диагностическим признаком для мониторинга и диагностики различных системных заболеваний соединительной ткани. ANA высокоспецифичны для СКВ. Кроме ревматических заболеваний, ANA обнаруживаются при хроническом активном гепатите; могут выявляться при инфекционном мононуклеозе, острых и хронических лейкозах, приобретенной гемолитической анемии, циррозе печени, малярии, лепре, ХПН, тромбоцитопениях, лимфопролиферативных заболеваниях. Тест является обязательным перед началом интерферонотерапии.

- Метод определения
Иммуноферментный анализ
- Материал для исследования
Сыворотка – 1 мл.
- Условия хранения:
 - < 5 дней при температуре 2-8 °С;
 - < 6 месяцев при температуре -20 °С.
- Забор материала осуществляется в вакуумную систему без антикоагулянта или с активатором свертывания. Цельная кровь должна быть доставлена в лабораторию в течение 2 часов при температуре 2-8 °С.

Анализ крови на LE-клетки

- LE-клетки – нейтрофильные лейкоциты, содержащие фагоцитированный гомогенный ядерный материал. Формирование LE-клеток происходит при наличии LE-фактора в плазме крови и других биологических жидкостях. LE-фактор при взаимодействии с ядром лейкоцита вызывает деполимеризацию ядерного хроматина, освобождение ядерного материала из клетки с последующим его фагоцитозом нейтрофильными лейкоцитами.

- LE-клетки могут быть обнаружены в крови при системной красной волчанке и некоторых других аутоиммунных заболеваниях.
- Материал для исследования
Плазма – 10 мл
- Условия хранения – 1 день при температуре 2-8 °С.
- Забор материала осуществляется в пластиковую пробирку с цитратом. Пробирку необходимо наполнить кровью до метки, немедленно перемешать и поместить в рефрижераторную центрифугу и отделить плазму.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

- Иммуноферментный анализ (ИФА) - это лабораторное исследование, основанное на реакции «антиген-антитело». Суть этого лабораторного метода - выявление специфических антител с помощью специальных биохимических реакций, которые помогают определить присутствие или отсутствие антител и их количество.

- ① Методом ИФА можно определить уровень гормонов, иммуноглобулинов, иммунологических комплексов и других биологически активных веществ. Материалом для исследования может служить кровь (ИФА крови), спинномозговая жидкость, содержимое стекловидного тела, околоплодные воды и т.д.



- Преимущества, которыми располагает ИФА по сравнению с другими методами детекции антигенов и антител: высокая чувствительность, которая, составляющая 90%; стабильность при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (год и более); быстрота и удобство проведения диагностической реакции; возможность использовать минимальные объемы исследуемого материала; возможность автоматизации всех этапов проведения реакции; небольшая стоимость диагностических наборов; возможность ранней диагностики инфекции; унифицированность и пригодность для массовых обследований; легкость в отслеживании динамики развития процесса инфекционного заболевания.

Недостаток

- ⦿ Недостаток - относясь к непрямым методам диагностики, он позволяет определить иммунный ответ организма на возбудителя, а не самого возбудителя.

- Метод иммуноферментного анализа используется для определения наличия антигенов возбудителей различных инфекций и для определения наличия антител классов (IgA, IgM, IgG) к антигенам различных возбудителей (вирусные гепатиты, ВИЧ, сифилис, TORCH, хламидиозы, паразитозы). С помощью ИФА можно определить антитела к любой инфекции, при условии, конечно, что организм их выработал.

- Этот метод позволяет различать острые и хронические формы заболеваний, выделять стадию заболеваний и выявлять практически здоровых носителей и контролировать вакцинацию. Необходимо заметить, что наличие антител в сыворотке крови или в патологическом материале может свидетельствовать лишь о контакте организма с возбудителем в настоящее время или в прошлом.

Реакция

иммунофлюоресценции (РИФ)

РИФ (метод Кунса). Различают три разновидности метода прямой, непрямой, с комплементом. Реакция Кунса является методом экспресс-диагностики для выявления антигенов микробов или определения антител.

Прямой метод РИФ основан на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, мечеными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа. Бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета.

Схема Реакции иммунофлюоресценции (РИФ) (Кунса)

Флуоресцентные
антитела (ФА)



Прямой метод

Ag Ag



Непрямой метод

- Непрямой метод РИФ заключается в выявлении комплекса антиген - антитело с помощью антиглобулиновой (против антитела) сыворотки, меченной флюорохромом. Для этого мазки из взвеси микробов обрабатывают антителами антимикробной кроличьей диагностической сыворотки. Затем антитела, не связавшиеся антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах антитела выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой (антикроличьей) сывороткой, меченной флюорохромами. В результате образуется комплекс микроб + антимикробные кроличьи антитела + антикроличьи антитела, меченные флюорохромом. Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе.

ИММУНОБЛОТ

- ИММУНОБЛОТ (western blot) – метод лабораторного исследования сыворотки крови на присутствие антител к ВИЧ; это более точный анализ, чем ИФА, и используется для подтверждения результатов ИФА. ИФА – иммуноферментный анализ (ELISA) – лабораторное исследование, позволяющее определить присутствие в крови ВИЧ-антител; тест на ВИЧ-антитела.

- По рекомендации ВОЗ иммуноблотинг (вестерн-блот) используется при диагностике ВИЧ-инфекции в качестве дополнительного экспертного метода, который должен подтверждать результаты ИФА . Обычно этим методом перепроверяют положительный результат при ИФА, поскольку он считается более чувствительным и специфичным, хотя более сложным и дорогим.

- Процедура иммуноблота состоит из нескольких стадий (см. рис.). Сначала предварительно очищенный и разрушенный до составных компонентов ВИЧ подвергается электрофорезу, при этом все входящие в состав вируса антигены разделяются по молекулярному весу. Затем методом блоттинга антигены переносят из геля на полоску нитроцеллюлозы или нейлонового фильтра, которые отныне содержат невидимый пока глазом спектр белков, характерный для ВИЧ. Далее на стрип наносится исследуемый материал (сыворотка, плазма крови пациента и т.п.), и если в пробе есть специфические антитела, то они связываются со строго соответствующими им полосками белков-антигенов. В результате последующих манипуляций (подобных ИФА) результат этого взаимодействия визуализируется - делается видимым. Наличие полос на определённых участках стрипа подтверждает присутствие в исследованной сыворотке антител к строго определённым антигенам ВИЧ.

