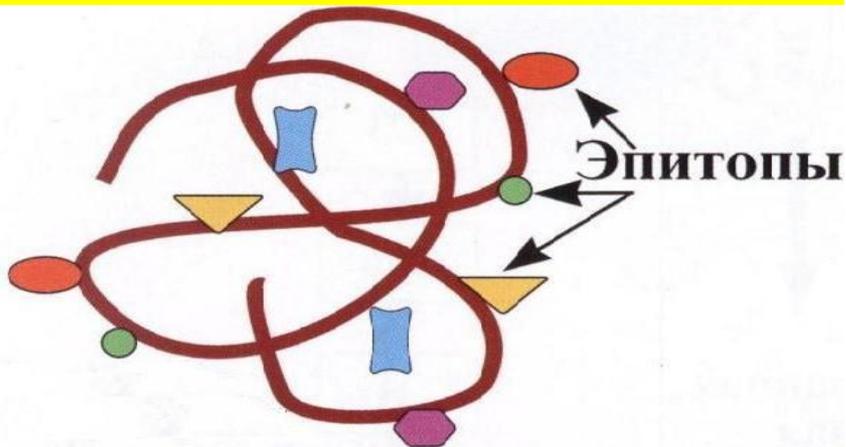


«Основные принципы оценки иммунной системы. Возрастные особенности. Основные виды нарушений функционирования иммунной системы - иммунодефицитные состояния; аутоиммунная патология; аллергия».

Цикл 1 - иммунология.
Занятие №5 в

Эволюция методов иммунного анализа- поликлональные и моноклональные антитела

При введении антигена в организме вырабатывается большое семейство антител, направленных к разным его эпитопам.



К одному и тому же эпитопу антигена также может образоваться целый спектр антител, отличающихся по структуре, степени специфичности и прочности связывания с эпитопом (это относится как к белковым, так и к полисахаридным антигенам).

Поликлональные и моноклональные антитела

Поликлональные антитела

В ответ на введение антигена в организме образуются многокомпонентные смеси антител к различным эпитопам антигена – поликлональные антитела, которые производят различные клоны клеток. Эти антитела которые широко используются для нейтрализации бактериальных токсинов (дифтерийного, столбнячного), змеиных ядов (кобры, гадюки), вирусов, попавших в кровь (особенно эффективно для вируса кори).

Моноклональные антитела

Антитела, вырабатываемые одним клоном клеток и направленные лишь к одной детерминанте антигена.

Именно моноклональные антитела используются в современные методах диагностики и терапии, так как они обеспечивают абсолютную специфичность в распознавании данного антигена.

1975 год: впервые получены моноклональные антитела (МАТ) с помощью гибридной технологии (Нобелевская премия 1984 года).

Моноклональные антитела

Иммуноглобулины, синтезируемые одним клоном клеток.

Моноклональное антитело

связывается только с одной антигенной детерминантой на молекуле антигена.

Гибридная технология

Слияние с помощью полиэтиленгликоля лимфоцитов селезенки предварительно иммунизированных организмов определенным антигеном с раковыми клетками, способными к бесконечному делению. Отбирают клоны клеток, синтезирующие необходимые антитела.

Гибридомы - бессмертные клоны клеток, синтезирующие моноклональные антитела.

Жорж Кёлер и Сезар Мильштейн.

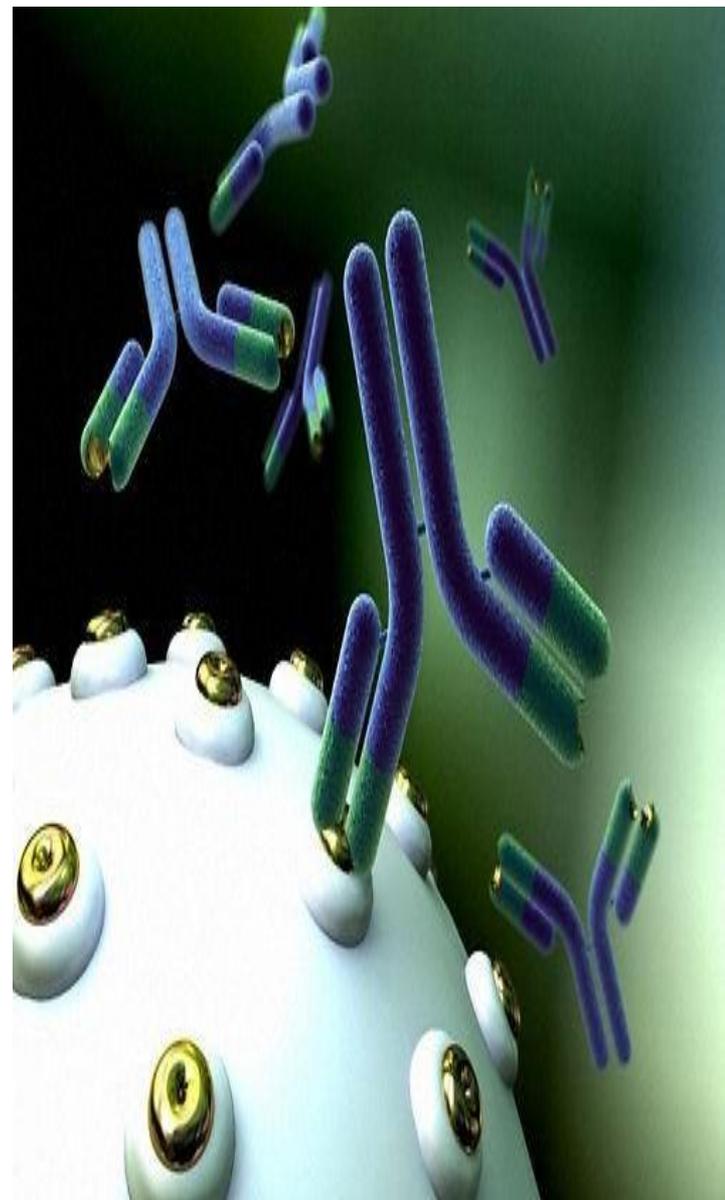
Нобелевская премия за создание моноклональных антител

Идея состояла в том, чтобы взять линию миеломных клеток, которые потеряли способность синтезировать свои собственные антитела и слить такую клетку с нормальным В – лимфоцитом, синтезирующим антитела, с тем, чтобы после слияния отобрать образовавшиеся гибридные клетки, синтезирующие нужное антитело.

Гибридная технология позволяет получить соматический гибрид нормальной антителообразующей и опухолевой клеток (*гибридома*) дает потомство, обладающее бессмертием опухолевой клетки и способностью к синтезу антител, унаследованному от клетки нормальной. **Гибридомы** продуцируют огромное количество моноклональных антител, обладающих уникальной специфичностью.

Биотехнология создания моноклональных антител

- Животное иммунизируют, в ответ на введение антигена в организме мыши активизируются продуцирующие антитела потомки В-лимфоцитов.
 - Эти клетки могут жить только в организме хозяина, при переводе на искусственную питательную среду они гибнут.
 - Если слить иммунную клетку с опухолевой, образуются гибридные клетки, способные неограниченно долго жить в искусственных средах. Одновременно они сохраняют способность синтезировать антитела.



Гибридомная технология



Гуманизированные антитела

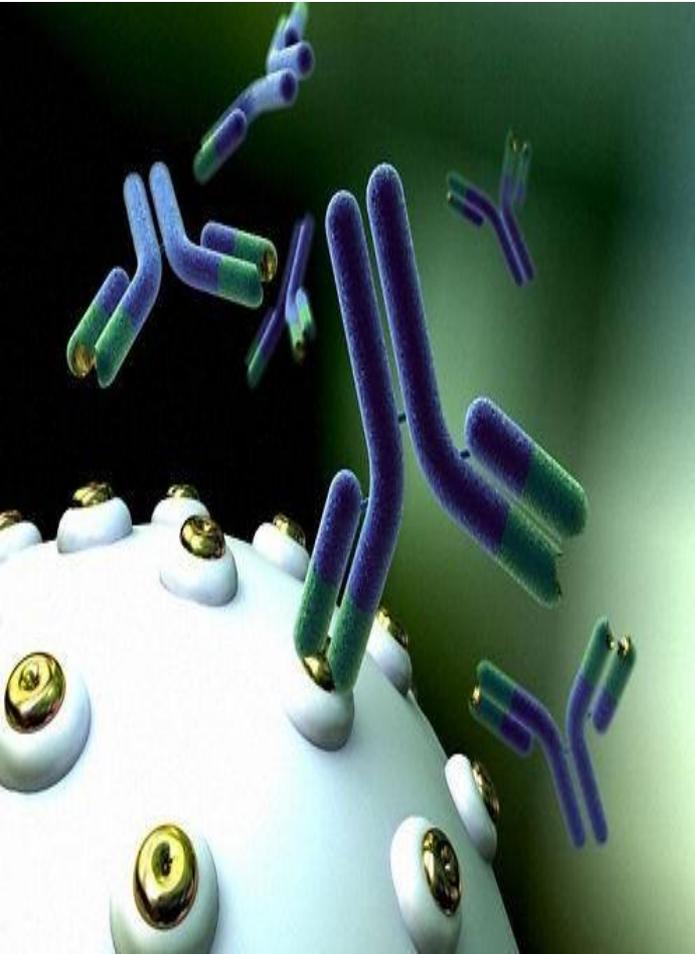
Мышиные лимфоциты синтезируют мышиные иммуноглобулины, введение таких моноклональных антител человеку вызывало иммунную реакцию отторжения.

В 1988 году Грег Винтер разработал специальную методику **гуманизации моноклональных антител** - замена в составе моноклональных антител белков мыши белковыми компонентами человека - **химерные (гуманизированные) антитела**.

Эволюция МоноАТ: мышинные- химерные- гуманизированные - человеческие



Моноклональные антитела – промышленное производство

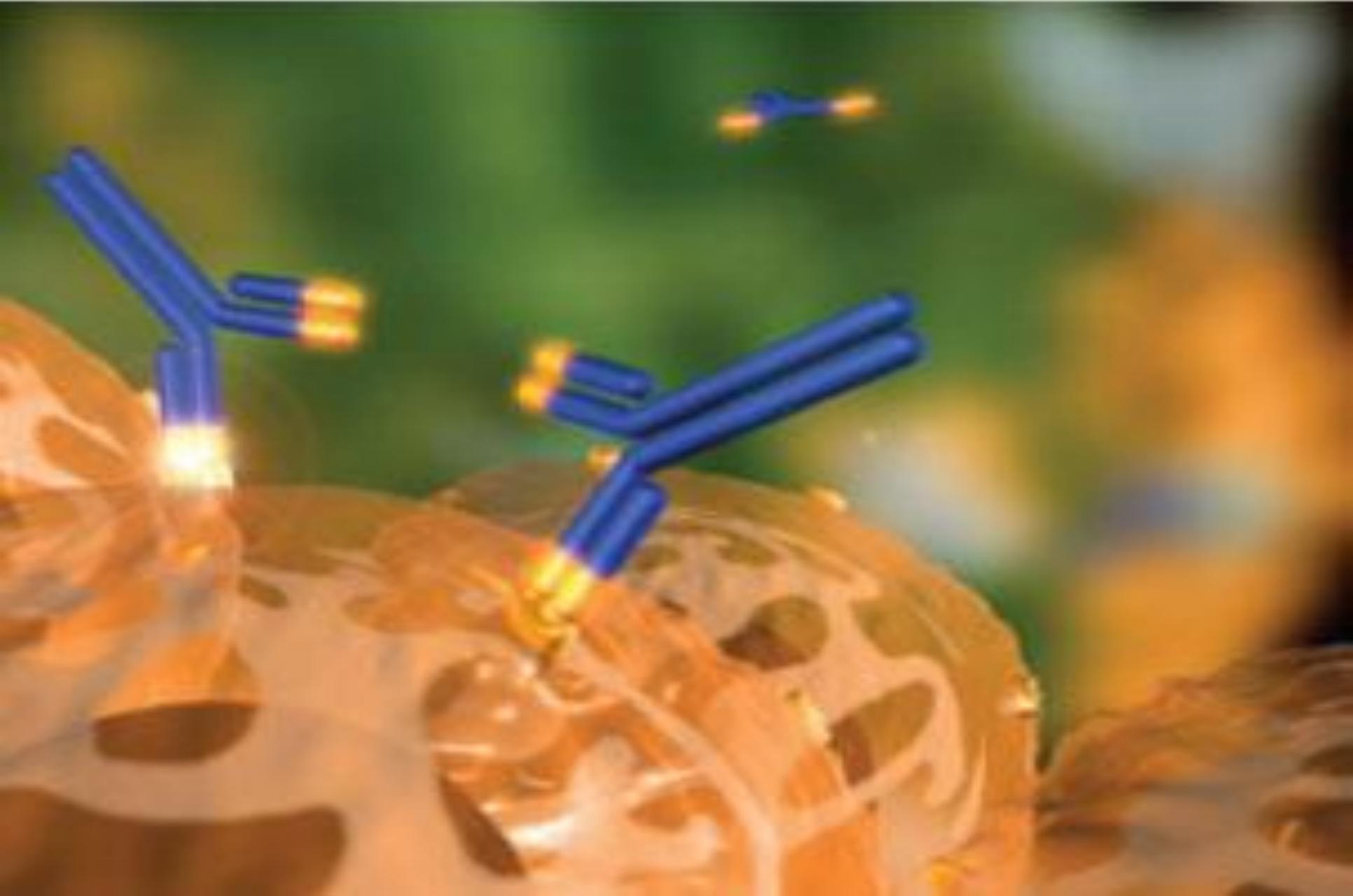


Применение моноклональных антител в клинической практике



1. **Терапия с использованием моноклональных антител**
(антицитокиновая терапия; анти - IgE – терапия и др.).
2. **Диагностические методы определения любых молекул**
(иммунный анализ).

1.Терапия моноклональными антителами



Псориаз

Возможными кандидатами на аутоантигены при псориазе являются кератин 13, гетерогенный ядерный нуклеопротеин-1.

Однако, точно аутоантигены при псориазе не установлены.

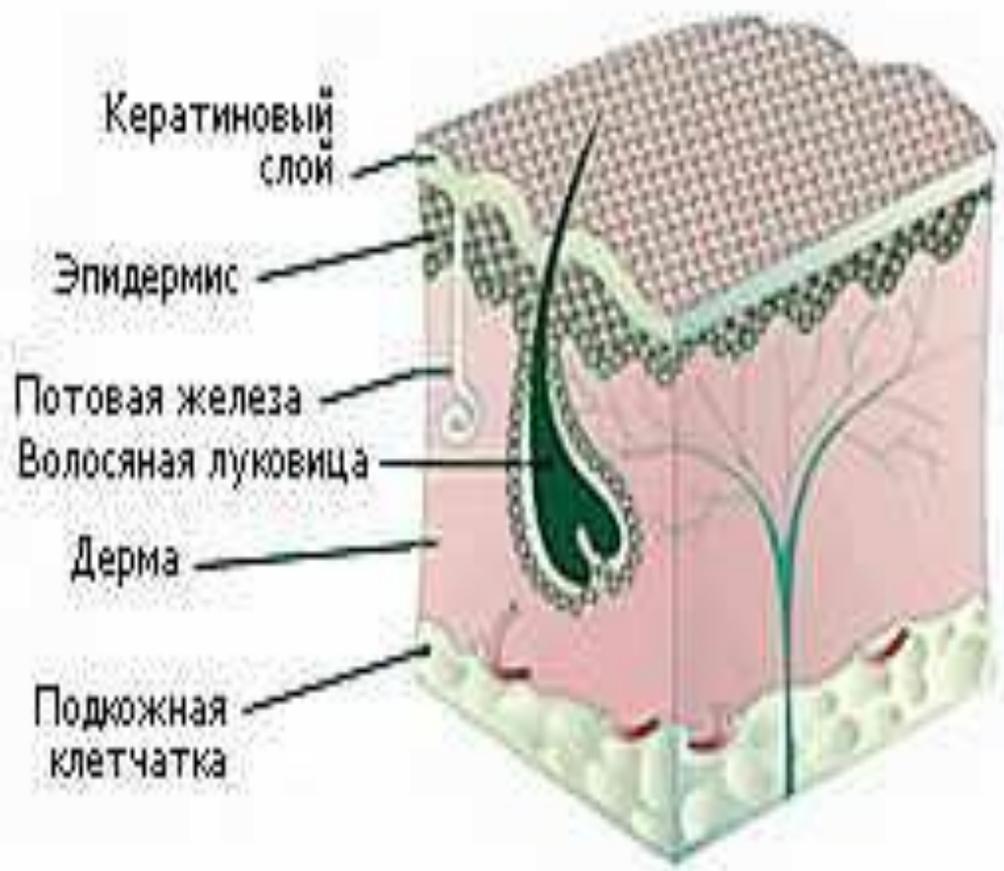
Считается, что это – аутоантигены кожи.



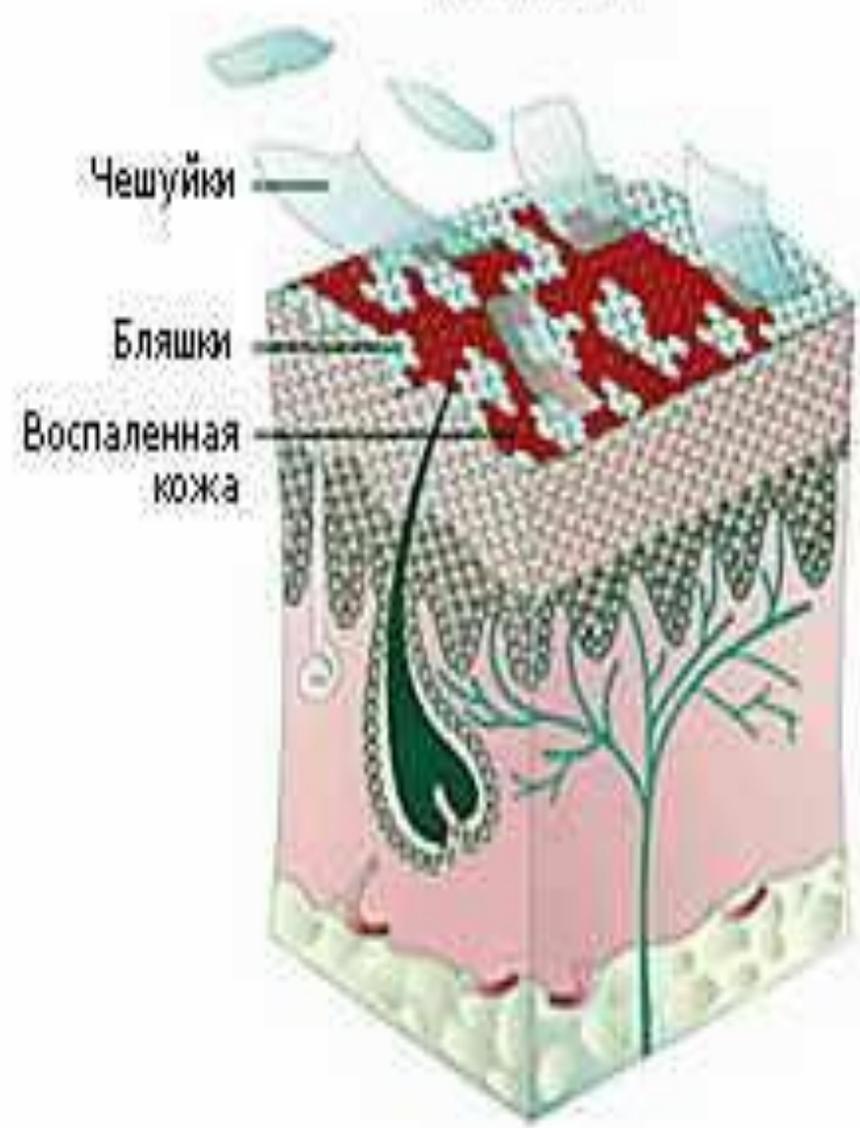
Псориаз: клинические проявления



Здоровая кожа



Псориаз



Псориаз: лечение моноклональными антителами

Активно используются для лечения псориаза, следующие препараты моноклональных антител:

инфликсимаб (препарат Ремикейд), блокада TNF-альфа;

адалимумаб (препарат Хумира), блокада TNF-альфа;

устекинумаб (препарат Стелара), блокада действия IL-23 и IL-12, блокада активации Т-клеток.



Ревматоидный артрит

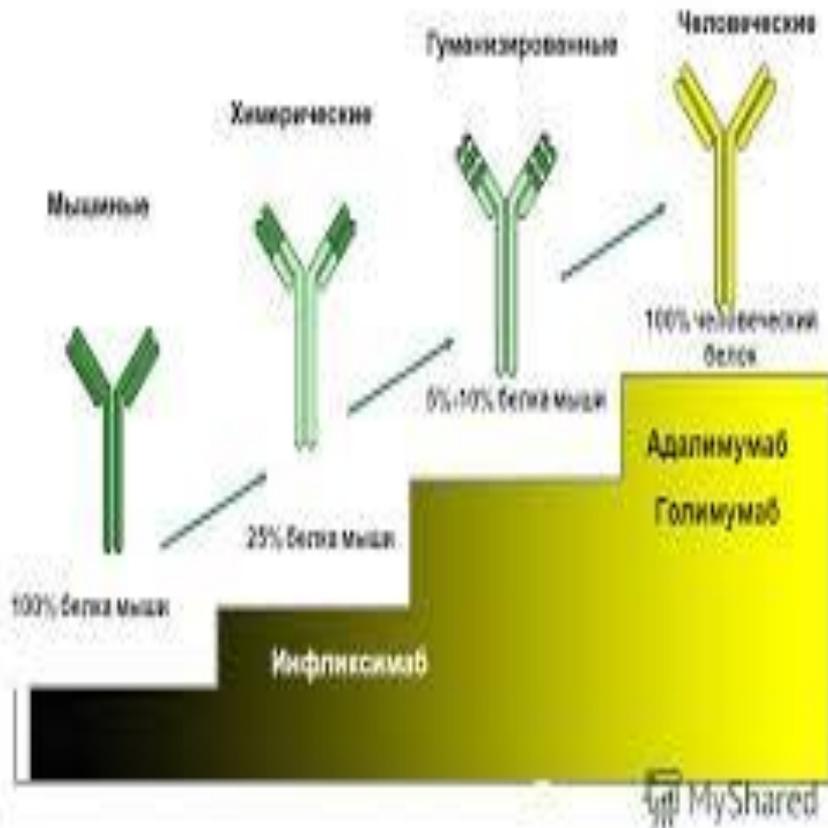
Иммунное воспаление в суставах приводит к появлению на суставных поверхностях костей эрозий, что в дальнейшем становится причиной развития выраженных суставных деформаций.

Возможные этиологические факторы:

- Вирус Эпштейна-Барр,
- стрептококки группы В.
(антигенная мимикрия: компоненты микробных и вирусных тел имеют сродство к тканям суставов, способны длительное время накапливаться в них и вызывать развитие воспаления).

Ревматоидный артрит

Моноклональные антитела к ФНО-α



АНТИЦИТОКИНОВАЯ ТЕРАПИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Основные провоспалительные цитокины, участвующие в патогенезе РА	Антицитокиновые препараты для терапии
ФНО	МАТ – инфликсимаб (гуманизированные) - адалимумаб (человеческие) Химерный рецептор - этанерсепт
ИЛ-1	Рецепторный антагонист ИЛ-1 МАТ
ИЛ-6	МАТ против рецептора ИЛ-6 (тоцилизумаб)
ИЛ-17	МАТ в разработке

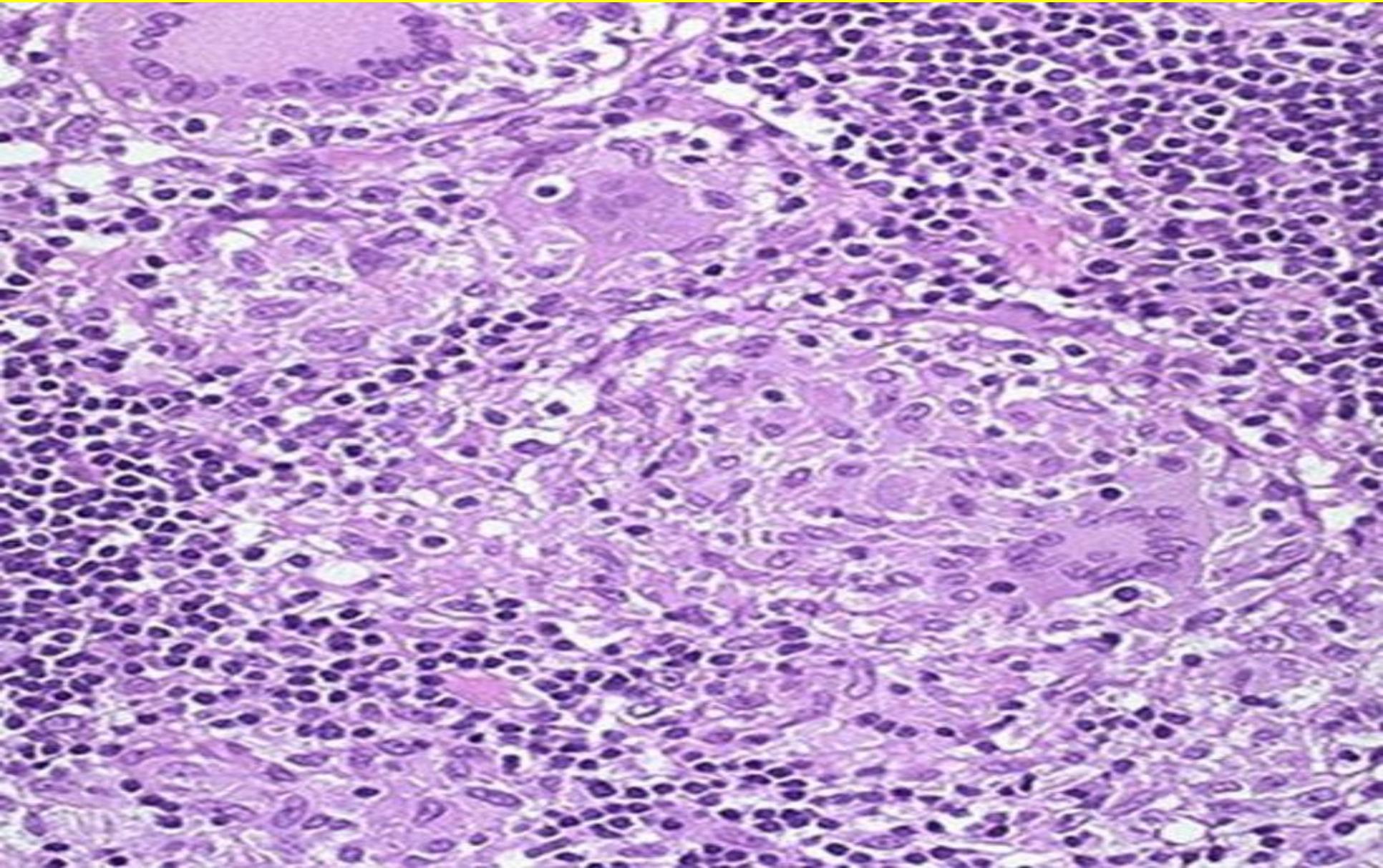
Лечение болезни Крона: ведолизумаб

Болезнь Крона - хроническое рецидивирующее воспалительное заболевание ЖКТ с поражением слизистой оболочки и подслизистого слоя и образованием гранулем.

Механизм патогенеза – ГЗТ.

Современная терапия:
Ведолизумаб -
- гуманизированное моноклональное антитело, связывающееся с интегрин-альфа4-бета7 - белком клеточной мембраны, ответственным за миграцию лейкоцитов в слизистую оболочку кишечника, и тем самым блокирующее чрезмерную воспалительную реакцию в этой области.

Болезнь Крона: гранулемы в слизистой толстой кишки



«Волшебные пули»: моноклональные антитела в онкологии

Алемтузумаб (Кэмпас) — препарата для терапии хронического лимфолейкоза.

Вариабельный регион (Fab-фрагмент) алемтузумаба соединяется с антигеном **CD52** на поверхности лимфоцитов, а константный регион (Fc –фрагмент) - с Fc-рецепторами на поверхности цитотоксических клеток, которые уничтожают мишень (антителозависимая клеточная цитотоксичность).

Кэмпас активирует систему комплемента, что приводит к образованию комплекса, разрушающего мембрану злокачественной клетки (комплемент-зависимая цитотоксичность).

Именно эти два механизма, а также индукция апоптоза считаются основными в действии данных антител,

Применение моноклональных антител в клинической практике

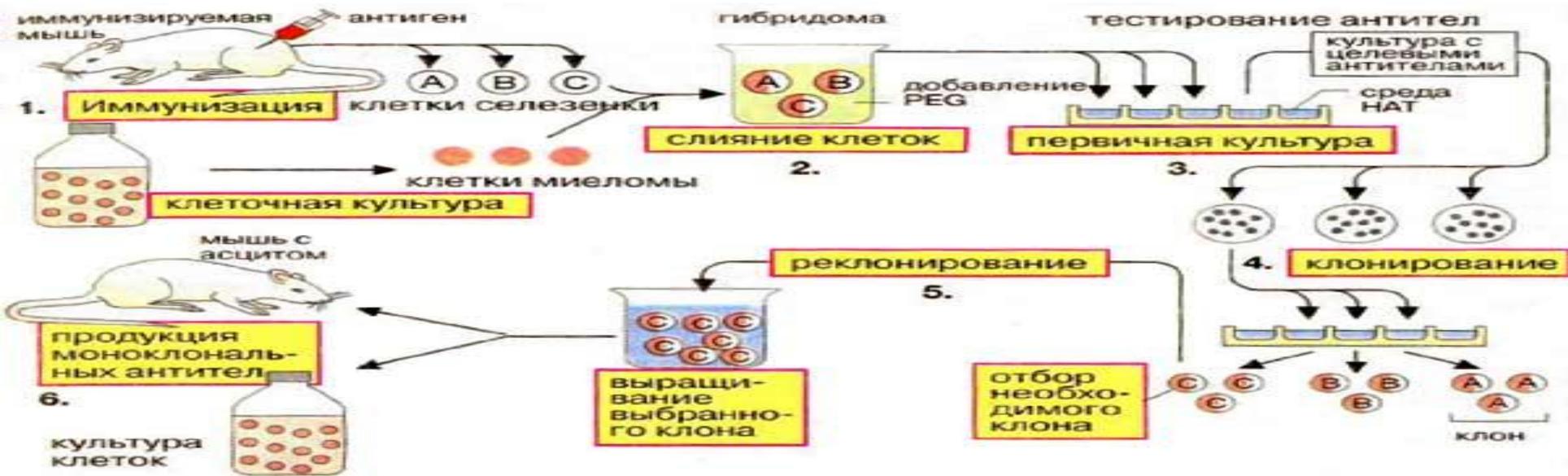


2. Диагностические методы определения любых молекул (точные методы иммунного анализа).
(ранее для определения лимфоцитов использовали методы розеткообразования с эритроцитами барана)

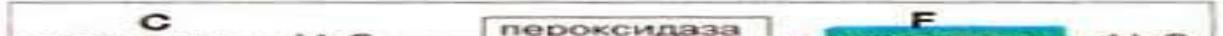
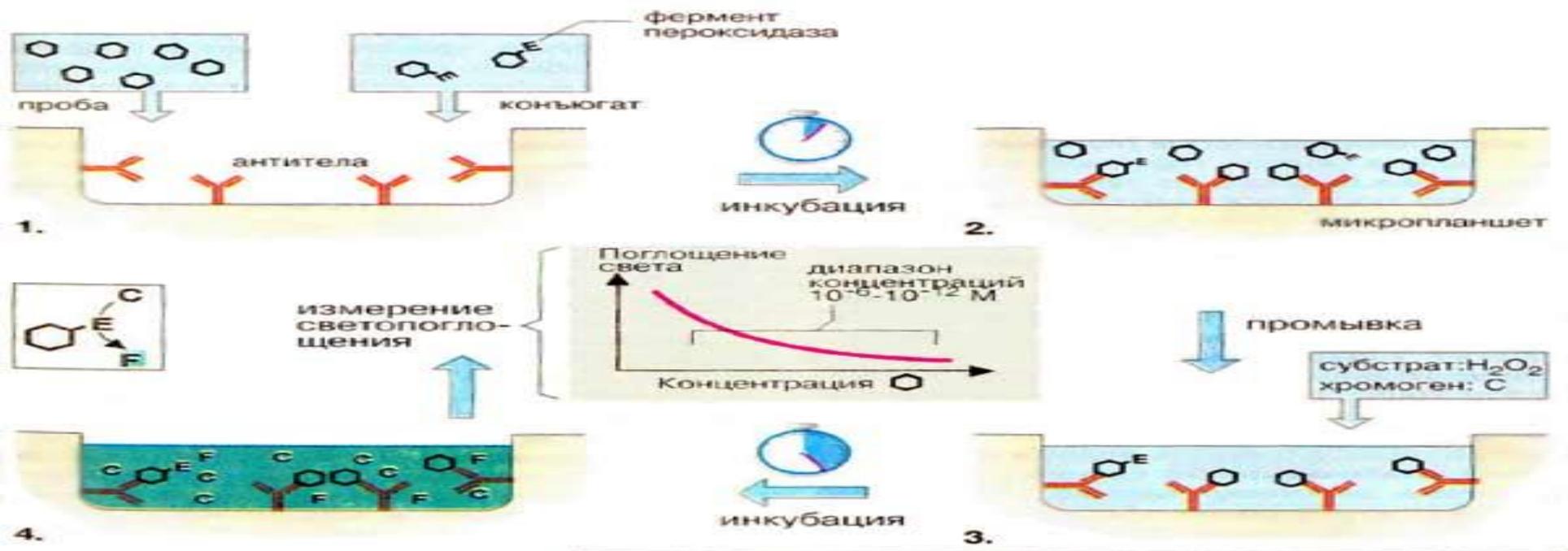
Иммунный анализ –использование моноклональных антител

Для выполнения иммунного анализа используются моноклональные антитела, созданные к определенным антигенам.

После образования иммунного комплекса (АГ-АТ) с помощью большого разнообразия методов производится визуализация комплекса АГ-АТ с последующим определением количества искомого вещества (антигенов или антител).



A. Моноклональные антитела



Исследование иммунной системы: иммунограмма и иммунный статус

Иммунограмма

Карта первичного обследования иммунного статуса, отражающая основные показатели тестов оценки иммунной системы человека.

Иммунный статус

Комплекс количественных и функциональных показателей, отражающих конкретное состояние иммунной системы человека в данный момент времени, определяемое с помощью стандартизированных и разрешенных методов.

Исследование иммунной системы: двухуровневый подход

Тесты первого уровня

Ориентировочные, легкодоступные, выполняются в лечебных учреждениях общего профиля, не требуют дорогостоящего оборудования и реактивов.

Тесты второго уровня

Более углубленное исследование состояния иммунной системы в специализированных иммунологических лабораториях, требующие дорогостоящей аппаратуры, реактивов, обученного персонала.

Тесты первого уровня выявляют «грубые дефекты» клеточного и гуморального звена врожденного и адаптивного иммунитета:

1. Определение абсолютного и относительного числа лейкоцитов и лимфоцитов крови
(клинический анализ крови)

2. Определение абсолютного и относительного числа:
- Т лимфоцитов (CD 3+);
- В лимфоцитов (CD 19 +);
- НК (натуральных киллеров) (CD 16/ CD 56 +).

Тесты первого уровня

3. Оценка субпопуляций Т лимфоцитов: CD4+-Т-хелперы; CD 8+Т цитотоксический; отношение CD 4+/ CD 8+ - иммунорегуляторный индекс.

4. Определение концентраций сывороточных иммуноглобулинов классов М; G; А.

5. Оценка фагоцитарной активности моноцитов и нейтрофилов.

6. Оценка бактерицидной активности фагоцитов (выработка кислородных радикалов).

7. Оценка активности системы комплемента.

Тесты второго уровня

В зависимости от задач, стоящих перед лечащим врачом, тесты второго уровня могут **варьировать**.

Цель выполнения тестов второго уровня-
выявить причины иммунологических нарушений, выявленных с помощью тестов первого уровня.

Тесты второго уровня

1. Определение числа Т хелперов 1,2,17 типов.
2. Определение числа Т регуляторных лимфоцитов (естественных и индуцибельных).
3. Определение числа $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов.
4. В онкогематологии: определение фенотипа клеток на разных стадиях иммунопоэза (для уточнения стадии малигнизации).
5. Определение маркеров активации клеток: CD25; CD 69; CD 71; HLA-DR.

Тесты второго уровня

7. Оценка пролиферативного ответа Т и В-лимфоцитов на митогены (поликлональные активаторы) или на конкретные антигены.
8. Изучение апоптоза в культуре лимфоцитов.

9. Определение цитокинов.
10. Различные этапы фагоцитоза и рецепторный аппарат фагоцитов.
11. Содержание различных компонентов системы комплемента.

Тесты второго уровня

12. Активность киллеров (натуральных киллеров и цитотоксических Т лимфоцитов) с определением гназимов/ перфоринов и осуществлением апоптоза через Fas/Fas L.

13. Оценка пролиферативного ответа Т и В-лимфоцитов на митогены (поликлональные активаторы) или на конкретные антигены.

14. Определение классов и подклассов иммуноглобулинов.

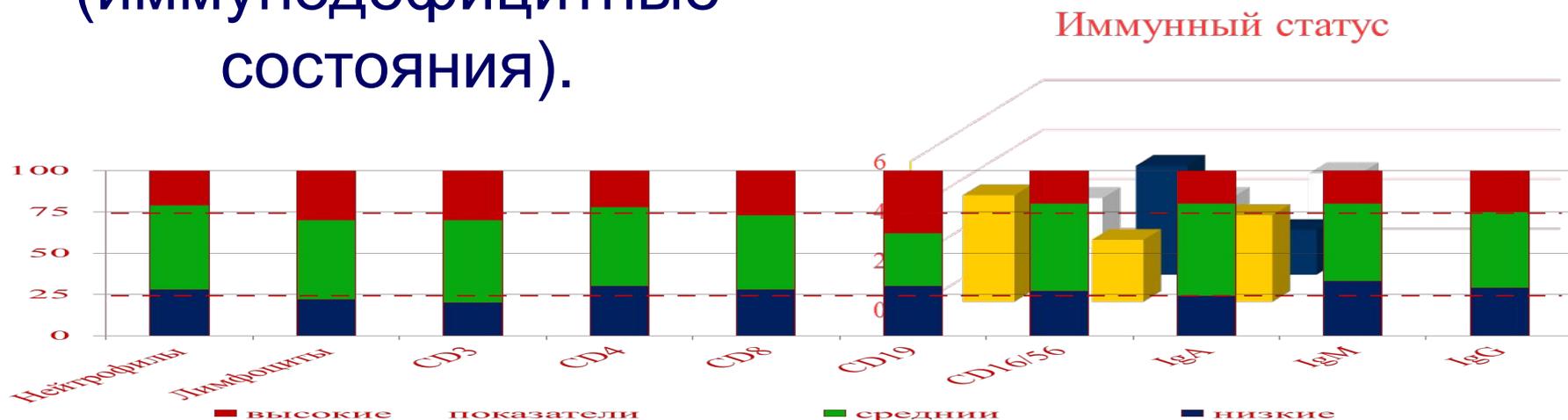
15. Определение цитокинов в различных биологических жидкостях.

Основные выводы по результатам оценки иммунного статуса:

1. Без существенных изменений иммунного статуса.

2. С недостаточностью иммунного ответа (иммунодефицитные состояния).

3. С повышенной активацией иммунного ответа (аутоиммунные заболевания, аллергия, воспаление).



2. Патологические состояния по результатам оценки иммунного статуса: иммунодефицитные состояния

Первичная иммунологическая
недостаточность **(ПИН)**

Наследственно -
обусловленные
дефекты иммунной
системы.

Вторичная иммунологическая
недостаточность **(ВИН)**

Нарушения иммунной
системы как у детей,
так и у взрослых, не
связанные с
генетическими
дефектами в иммунной
системе.

3. Патологические состояния по результатам оценки иммунного статуса:
состояния с повышенной активацией иммунного ответа (аутоиммунные заболевания, аллергия, воспаление).

Аутоиммунные
заболевания –

Заболевания, в основе патогенеза которых лежит иммунный ответ, направленный против антигенов клеток и межклеточного вещества собственного организма.

Аутоантигены

Антигены собственного организма,
не стимулирующие
запуск иммунного
ответа в норме

Этиологический принцип оценки иммунного статуса- выбор наиболее информативных тестов для оценки иммунного статуса в соответствии с этиологией

Вирусная инфекция

- Система интерферонов.
- Активность цитотоксических клеток.
- Определение цитокинов (TNF- α , IL-12 и др.)

Бактериальная инфекция

- Фагоцитарная и оксидативная активность фагоцитов.
- Число В-лимфоцитов.
 - Уровни иммуноглобулинов.
- Активность системы комплемента.

Все иммунологические методы,
адаптированные к клинической практике,
подразделяются на:

Скрининговые

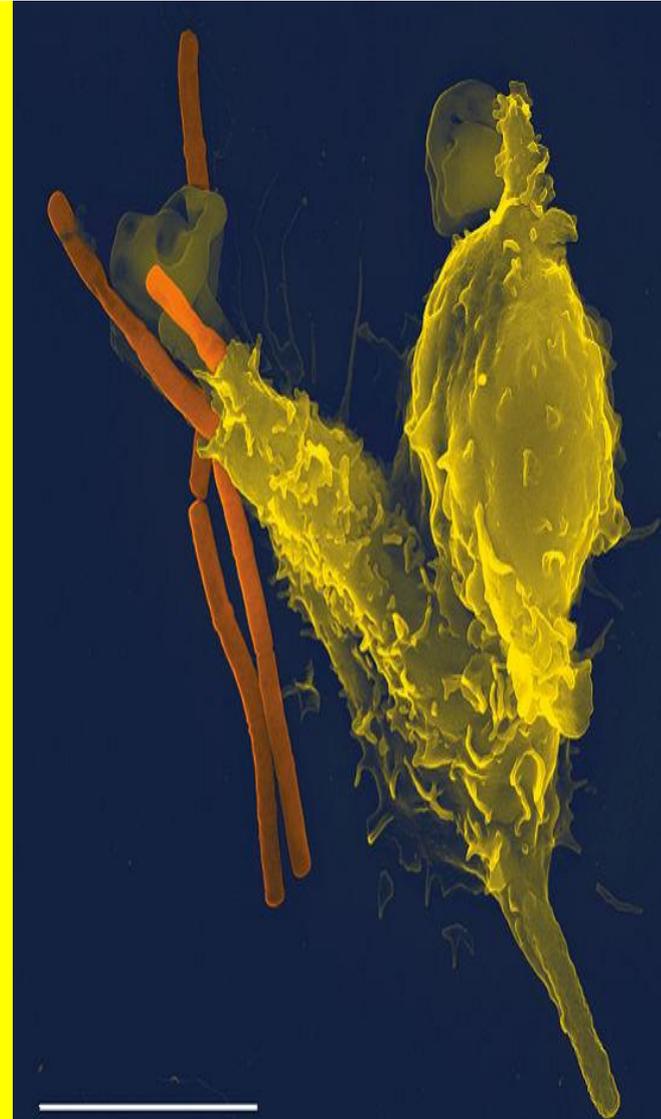
Уточняющие

Позволяют установить
те или иные
нарушения
функционирования
иммунной системы.

Позволяют объяснить
механизмы таких
нарушений.

Скрининговые методы оценки фагоцитов (нейтрофилов)

- Оценка **абсолютного числа** нейтрофилов
- Исследование **интенсивности фагоцитоза** (Фагоцитарное число –
- % фагоцитирующих клеток, Фагоцитарный индекс – среднее число частиц, поглощенных одной клеткой).
- **Бактерицидность** (по НСТ - тесту или с помощью метода хемилюминесценции).



Система нейтрофилов: норма

Функции	Показатель	Значения у здоровых
Адгезионная способность	Число клеток, %	40 - 55
Миграционная способность (Индекс миграции, усл.ед.)	FMLP	2.6 – 2.8
	IL-8	1.7 – 3.0
Поглотительная способность	Фагоцитарное число, %	42.0 – 83.0
	Фагоцитарный индекс, усл.ед.	3.6 – 8.2

Система нейтрофилов: норма

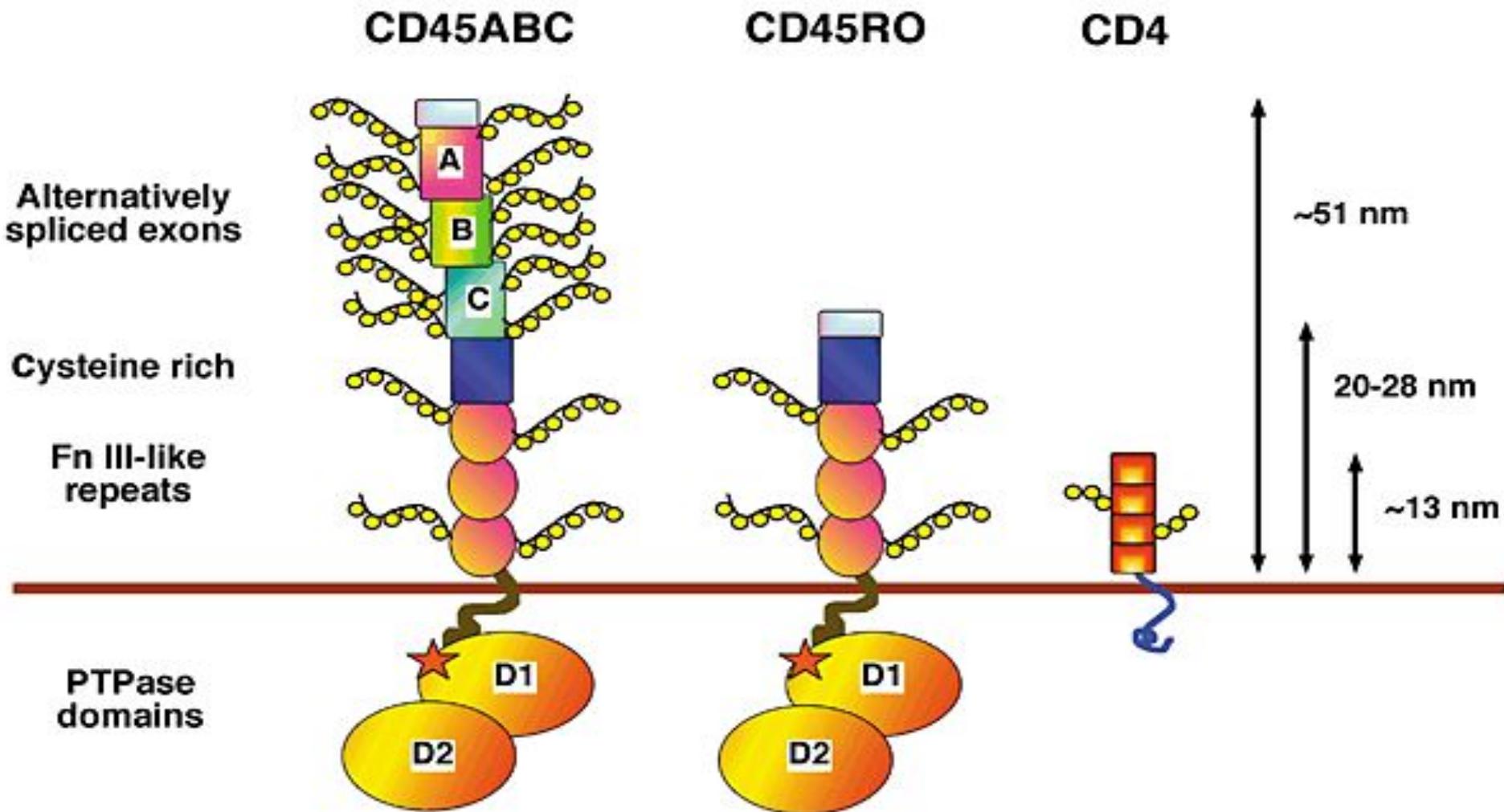
Бактерицидность	Спонтанная	Индуцированная	Индекс
НСТ - тест условн.ед.	70 - 120	150 - 200	1.2 – 2.0
Хемилюминесценция mV	0.9 – 2.8	7.2 – 18.5	5 - 8

Уточняющие методы оценки система фагоцитов (нейтрофилов)

Оценка
интенсивности
хемотаксиса
(направленной
миграции клеток)

Исследование
адгезионной
способности
нейтрофилов к пластику,
либо исследование
интенсивности
экспрессии адгезионных
молекул на поверхности
клетки (CD11/CD18).

CD : кластеры дифференцировки клеток - система картирования поверхностных структур



Скрининговые методы оценки Т- лимфоцитов

- Определение **общего числа лимфоцитов**
 - Определение процентного и абсолютного числа зрелых Т-лимфоцитов (**CD3+** клеток)
 - и двух основных популяций – **CD4+**(хелперов) и **CD8+** (цитотоксических) клеток.
- Исследование ответа Т-лимфоцитов в реакции бласттрансформации (РБТЛ) , либо определение маркеров пролиферации - то есть **оценка способности Т клеток к делению** (клональной экспансии).

Уточняющие методы оценки Т- лимфоцитов

- Определение маркеров активации Т-лимфоцитов – экспрессии CD25 (рецептор к интерлейкину 2)
- и молекул HLA II класса на поверхностной мембране т лимфоцитов.

- Исследование продукции цитокинов.
 - Изучение пролиферативного ответа Т лимфоцитов в реакции бласттрансформации на специфические антигены.

Оценка Т-клеточного звена иммунитета

Т-клеточный
иммунодефицит
характеризуется

: ↓CD3+,
↓CD4+,
↓CD4+/CD8+,
↓CD25+

Активация клеток :

↑ CD25+ , ↑ HLA II

Аутоиммунный
компонент:

↑ CD4+/CD8+ (за счет
миграции CD8+ в
орган-мишень),
↑ CD16/56+

Скрининговые методы оценки В лимфоцитов

- Определение процентного и абсолютного числа В-лимфоцитов (CD 19+ клеток).
- Определение уровней «неспецифических» иммуноглобулинов классов А,М, G,Е

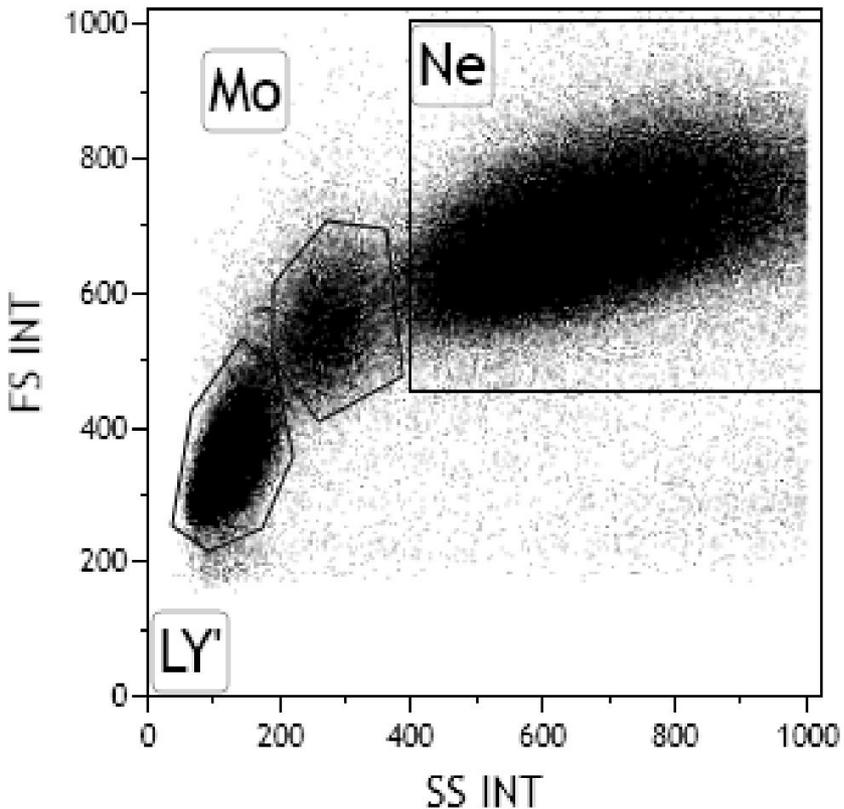
- Определение циркулирующих иммунных комплексов.
- Исследование пролиферативной активности В - лимфоцитов на В - митогены.

Уточняющие методы оценки В лимфоцитов

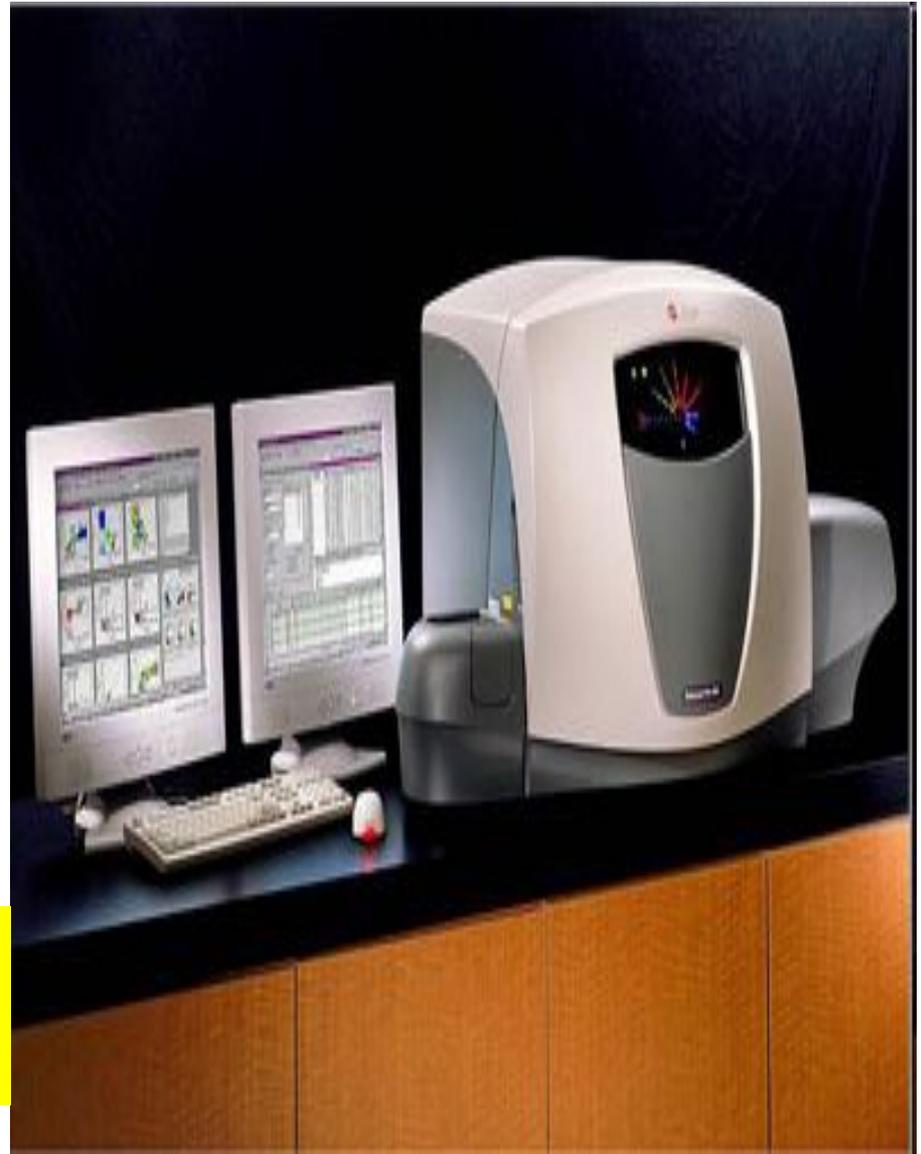
- Определение «специфических» (т.е. выработанных на конкретный антиген) иммуноглобулинов классов А, М, G и субклассов G 1-4

- Определение продукции цитокинов
- Определение секреторного иммуноглобулина класса А (s IgA).

Проточная цитометрия: иммунофенотипирование клеток



CD3/CD4/CD8/CD45
CD3/CD19/CD16+56/CD45



Показатели клеточного иммунитета в зависимости от возраста

Возраст	1-3 года	4-6 лет	7-17 лет	>18 лет
CD3, %	52 – 56	61 – 65	63 – 69	67 -76
CD3, абс. ($\times 10^3/\text{мм}^3$)	2.6 – 3.3	2.6 – 3.1	1.8 -3.1	1.5 – 2.5
CD4, %	21 – 33	39 – 51	39 – 47	43 – 48
CD4, абс.	1.0 – 1.9	1.7 – 2.4	0.8 – 2.1	0.4 – 1.6
CD8, %	24 – 28	23 – 25	23 – 29	21 – 26
CD8, абс.	1.2 – 1.6	0.9 – 1.2	0.5 – 1.3	0.2 – 0.8
CD4/CD8, У.ед.	1.0 – 1.4	1.6 – 2.2	1.4 - 2.0	1.7 – 2.1

Показатели клеточного иммунитета в зависимости от возраста

Возраст	1-3 года	4-6 лет	7-17 лет	>18 лет
CD16/56, %	6 – 17	6 – 17	6 – 17	6 – 17
CD16/56, абс.	0.4 – 0.7	0.3 – 0.8	0.1 – 0.8	0.1 – 0.6
CD20, %	21 – 33	20 – 30	10 – 14	2 – 20
CD20, абс.	0.4 – 0.7	0.3 – 0.8	0.1 – 0.8	0.1 – 0.6

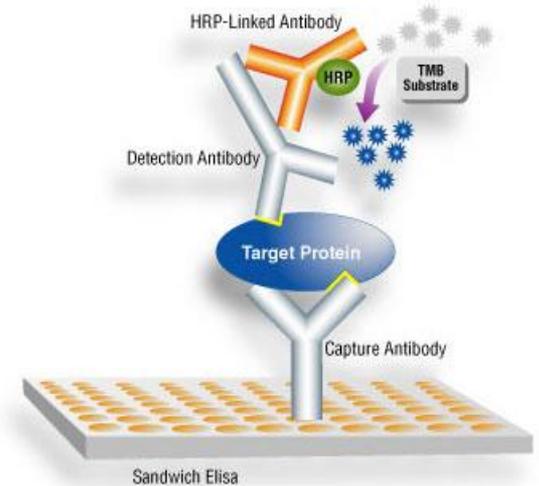
Методы оценки гуморального звена

Метод иммуноферментного анализа (ИФА) основан на реакции антиген-антитело и используется для регистрации либо антигенов, либо антител – в зависимости от задач.

Для регистрации комплексов АГ-АТ используются флуоресцентные методы, хемилюминесцентные электрохимические и другие способы визуализации иммунных комплексов.

ИФА – иммуноферментный анализ

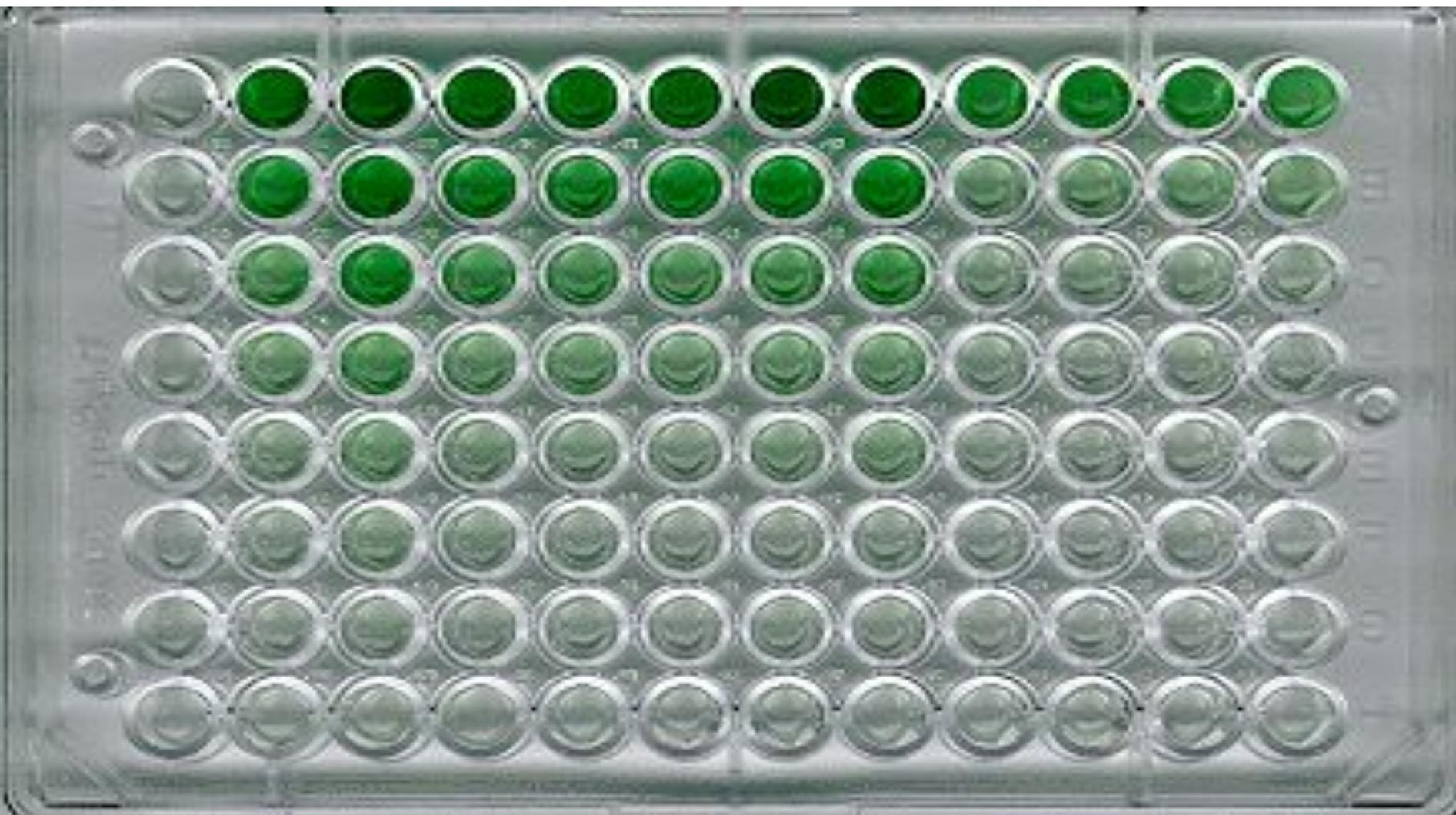
1. Основан на взаимодействии антител с антигеном.
2. Уже более 50-ти лет используется для определения различных соединений (как в науке, так и в клинической диагностике).
3. Метод рутинный, с низкой себестоимостью, легок в использовании, имеет множество модификаций в зависимости от задач. 10 000 публикаций ежегодно.



В то же время метод имеет ряд ограничений:

1. Требуется довольно большое количество образца.
2. Неспецифическое взаимодействие.
3. В подавляющем большинстве случаев используется фермент-опосредованное усиление сигнала.
4. Ограниченная производительность – 96 луночный планшет.

Полистироловый 96 - луночный планшет для иммуноферментного анализа (твердая фаза)



Иммуноферментный анализ: определение антител

Ag,
сорбированный
на твердой фазе

Определяемое
Ab

Конъюгат
фермента и
Ab

Расщепление
хромогена, с
образованием
красителя

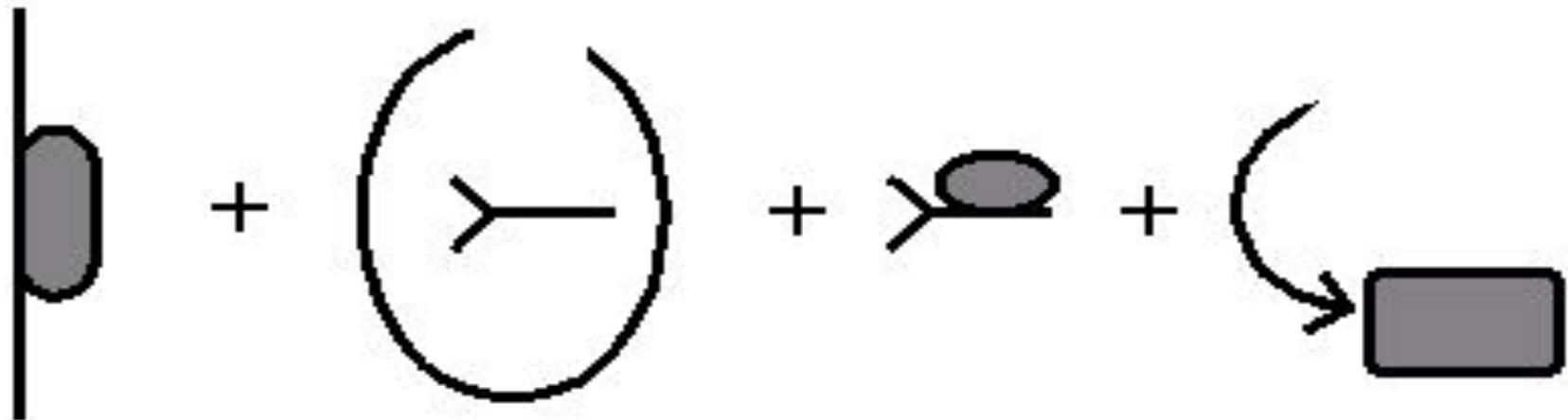


Рис. 1.а. Определение специфических антител.
Последовательность анализа

Иммуноферментный анализ: определение антител



Рис. 1.6. Определение иммунного комплекса.
Положительный результат теста.

Иммуноферментный анализ: определение антител



Рис. 1.в. Отсутствие иммунного комплекса.
Отрицательный результат теста.

Иммуноферментный анализ: определение антигенов



Рис. 2.а. Определение антигена.
Последовательность анализа

Иммуноферментный анализ: определение антигенов

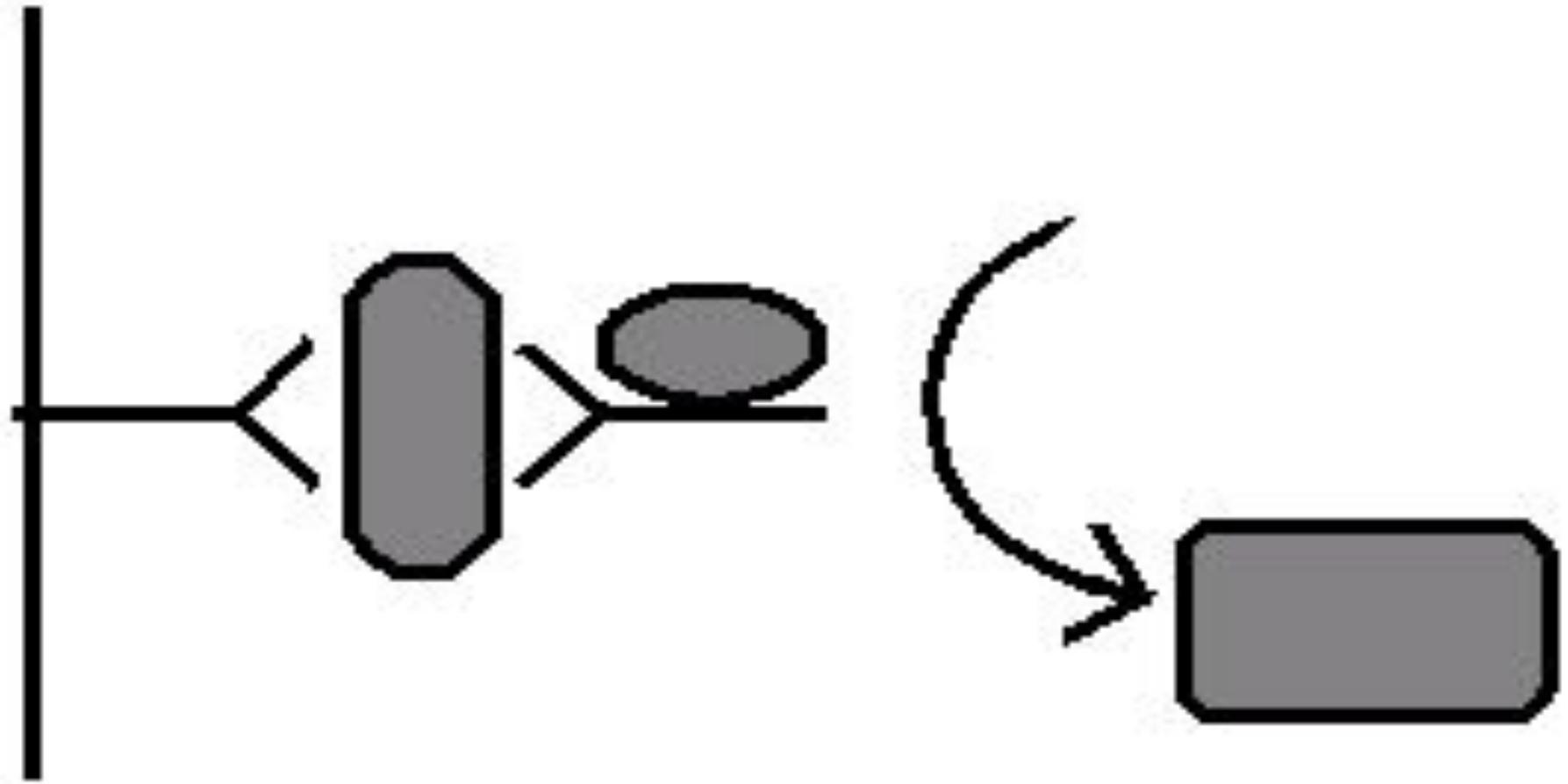


Рис. 2.6. Определение иммунного комплекса. Положительный результат теста.

Иммуноферментный анализ: определение антигенов

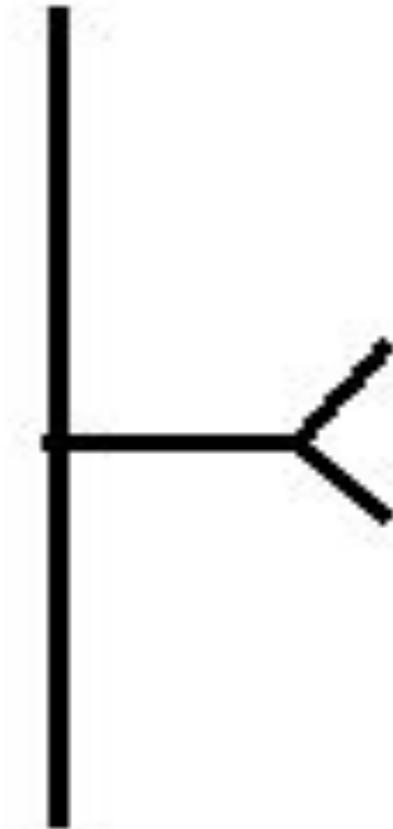


Рис. 2.в. Отсутствие иммунного комплекса.
Отрицательный результат теста

Модификации 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-маркёра, связавшегося с АТ



Непрямой метод

АТ-положительная сыворотка

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



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

АТ-отрицательная сыворотка

1. Неспецифичные АТ в исследуемой сыворотке не связывают Аг, фиксированный



2. Специфичные АТ, меченные ферментом, взаимодействуют с фиксированным Аг — содержание маркёра высокое

Показатели гуморального иммунитета в зависимости от возраста (lg, г / л)

возраст	Ig A	Ig G	Ig M
1 месяц	0.02 – 0.50	2.5 – 9.0	0.20 – 0.80
2 – 5 месяцев	0.04 – 0.80	2.0 – 7.0	0.25 – 1.00
6 – 9 месяцев	0.08 – 0.80	2.2 – 9.0	0.36 – 1.00
10 – 12 месяцев	0.15 – 0.90	2.9 – 10.7	0.40 – 1.50

Показатели гуморального иммунитета в зависимости от возраста (lg, г / л)

возраст	Ig A	Ig G	Ig M
1 год	0.15 – 1.10	3.4 – 12.0	0.45 – 1.80
2 – 3 года	0.18 – 1.50	4.2 – 12.0	0.50 – 2.00
4 – 5 лет	0.25 – 1.60	4.6 – 12.4	0.50 – 2.50
6 – 8 лет	0.35 – 2.00	6.5 – 16.0	0.50 – 5.50

Показатели гуморального иммунитета в зависимости от возраста (Ig, г / л)

Возраст	Ig A	Ig G	Ig M
9 – 12 лет	0.45 – 2.50	6.5 – 16.0	0.5 – 2.5
> 12 лет	0.45 – 3.50	6.5 – 16.0	0.5 – 2.5

Иммунные комплексы (АГ-АТ)

Белки
комплемента
снижают число
антигенных
эпитопов
(т.е. валентность
антигена),
с которыми могут
связаться
антитела.

Это приводит к уменьшению
размера иммунных
комплексов и делает их
растворимыми.

Такие содержащие
компоненты комплемента
иммунные комплексы легко
связываются с С3b-
рецепторами на
поверхности эритроцитов и
выводятся из организма.

Иммунные комплексы

Иммунные комплексы, не связанные с эритроцитами, активно поглощаются печенью, затем высвобождаются вновь и откладываются в таких тканях, как кожа, почки, мышцы, вызывая в них воспалительные реакции.

Иммунные комплексы, связанные с эритроцитами, реже оказывают повреждающее действие, эффективно элиминируются макрофагами в селезенке и печени. При недостаточности системы комплемента клиренс из организма иммунных комплексов нарушается.

Иммунные комплексы (АГ-АТ)

Откладываться иммунные комплексы могут, например, в почечных клубочках, в легочной ткани, вызывая воспалительные реакции.

Длительное отложение иммунных комплексов на эндотелии приводит к развитию «болезней иммунных комплексов» -с активацией системы комплемента, нейтрофилов, разрушением собственных тканей.

Состав иммунных комплексов

Заболевание	Антигены	Антитела
СКВ	ДНК, нуклеопротеины	IgG, IgM, IgA
гепатит	HBs-антиген	IgG, IgM
Сифилитическая нефропатия	антигены <i>Tr. pallidum</i>	IgG
Карцинома ЖКТ	Карциноэмбриональный антиген	IgG, IgM
Бактериальный эндокардит/гломерулонефрит	стрептококковые антигены	IgG

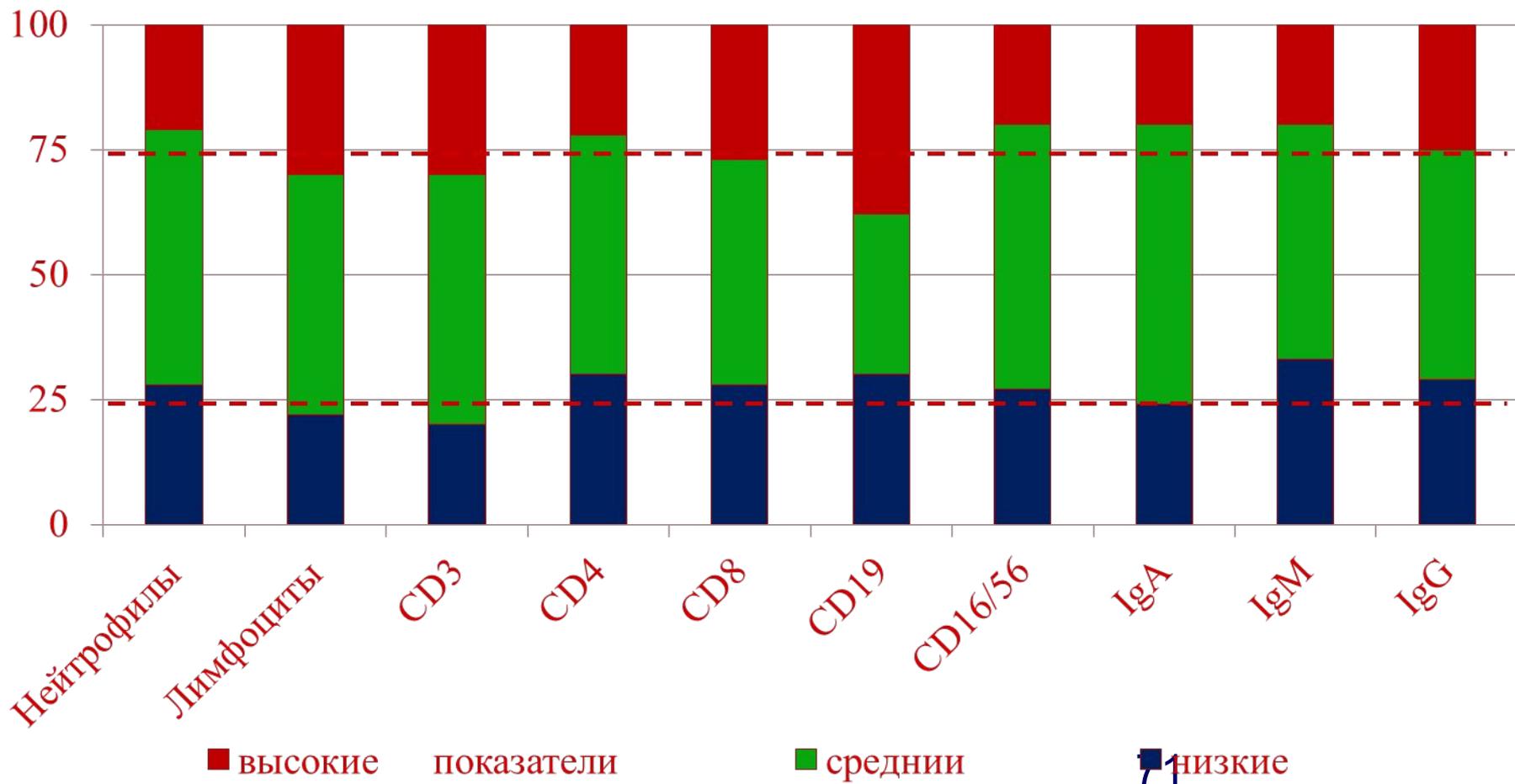
Уровни иммунных комплексов у здоровых лиц

Возраст	3 – 5 лет	6 – 8 лет	9 – 11 лет	старше 12 лет
ЦИК, %	59 - 112	48 - 96	49 - 100	51 - 120

Определение компонентов системы комплемента в сыворотке крови методом ИФА (мкг/мл)

C1q	100 – 250
C3	700 – 1800
C3a	0.05 – 0.15
C4	200 – 500
C5a	0.01 – 0.03
C1-ингибитор	150 - 350

Основные иммунологические показатели при инфекционно-воспалительных заболеваниях



Биологический материал для определения концентрации цитокинов (мультиплексный анализ)

- **Периферическая кровь**

- сыворотка крови
- плазма крови (ЭДТА)

- **Биологические жидкости**

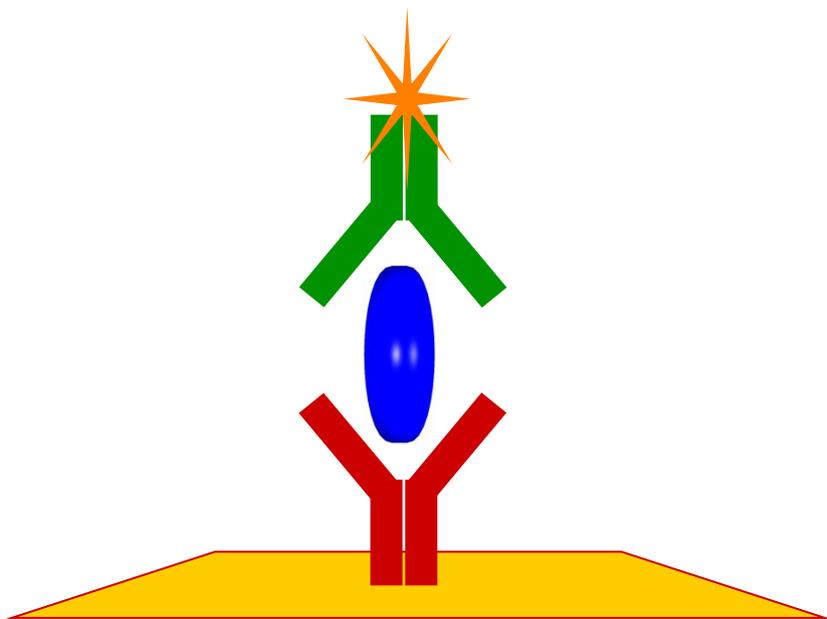
- цереброспинальная жидкость
- секреты
- СМЫВЫ
- моча
- лаважная жидкость
- **Экстракты тканей**

Технология xMAP

xMAP

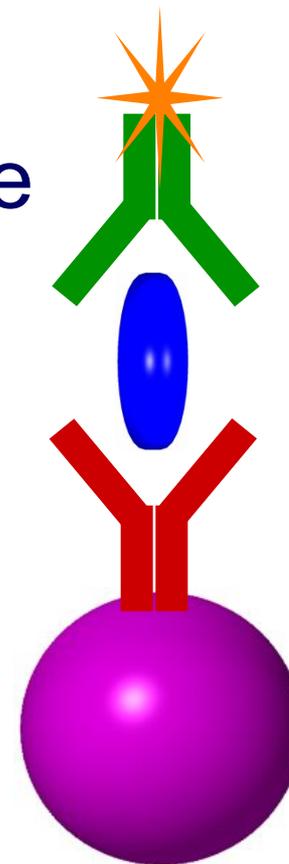


Анализ на
плоскости



ELISA (ИФА на
планшетах)

Анализ на
микросфере



ELISA (ИФА)
на бусине

хМар технология

хМар микросферы

Проточный цитофлуориметр

- Проточная система и кювета
- Двухлазерная компоновка
- Детекция флюоресцентного сигнала

Карта микросфер (регионы)

Каждый класс микросфер
картируется
– 100 регионов

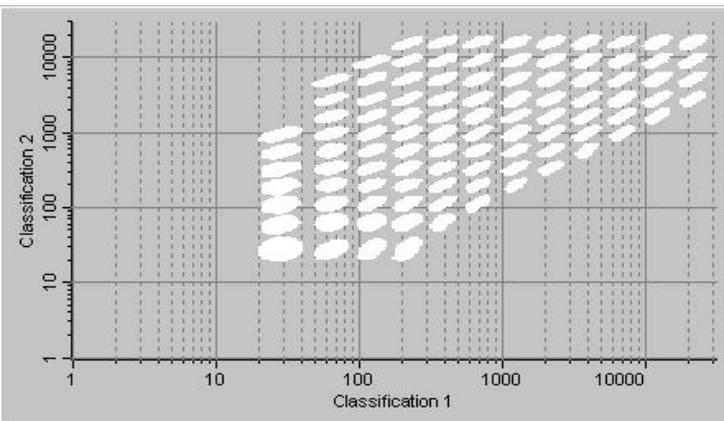
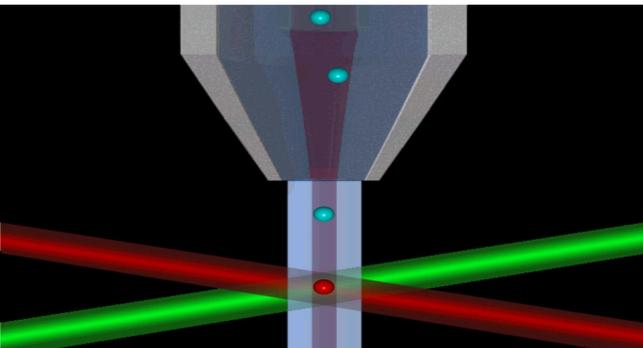
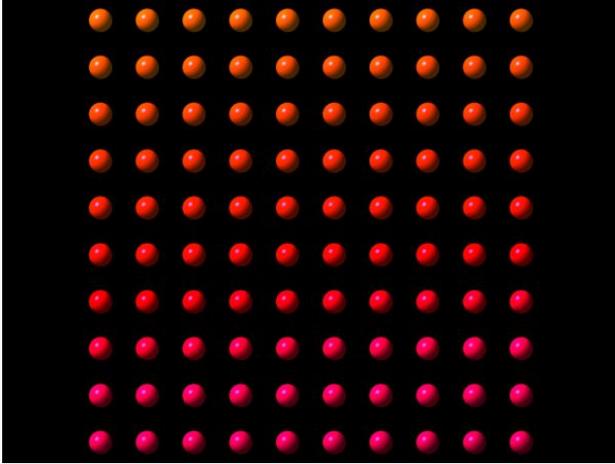
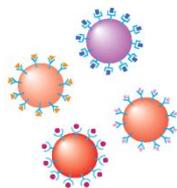
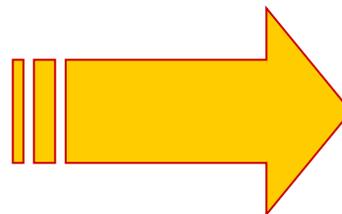


Схема эксперимента

1. Смешать образцы, стандарты, контроли и микросферы с пришитыми к ним первичными антителами



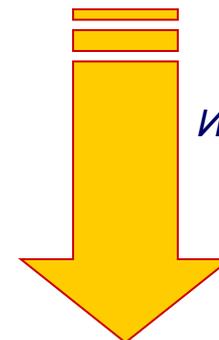
Инкубация 30 мин



2. Добавить детектирующие биотинилированные антитела

Между каждым этапом - промывка Bio-Plex Pro Wash Station

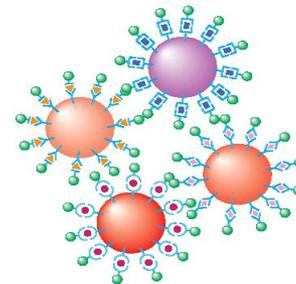
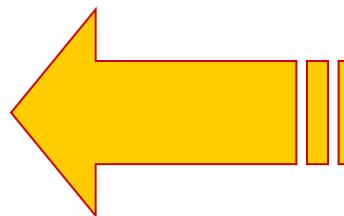
Инкубация 30 мин



3. Детекция: стрептавидин-ФЭ

Инкубация 10 мин

4. Считывание результатов в приборе Био-Плекс 200



Анализ цитокинов – за 3,5 часа

Приборы для x-MAP технологии



Luminex-100

Luminex-200



Анализ цитокинов

Гемопоэтическая:	IL-1 β , IL-6, G-CSF, GM-CSF, IFN γ
Аутоиммунная:	IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF α
Воспалительная:	IL-6, IL-8, G-CSF, TNF α
Th1/Th2:	IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN γ , TNF α
17-плексная:	IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , TNF α , MCP-1, MIP-1
23-плексная:	IL-1 α , IL-2R, IL-3, IL-12(p40), IL-16, IL-18, CTACK, GRO- α , HGF, ICAM-1, M-CSF, IFN- α 2, LIF, MCP-3, MIF, MIG, β NGF, SCF, SCGF- β , SDF-1 α , TNF- β , TRAIL, VCAM-1
27-плексная:	IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, Basic FGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF α , VEGF

Диагностические возможности

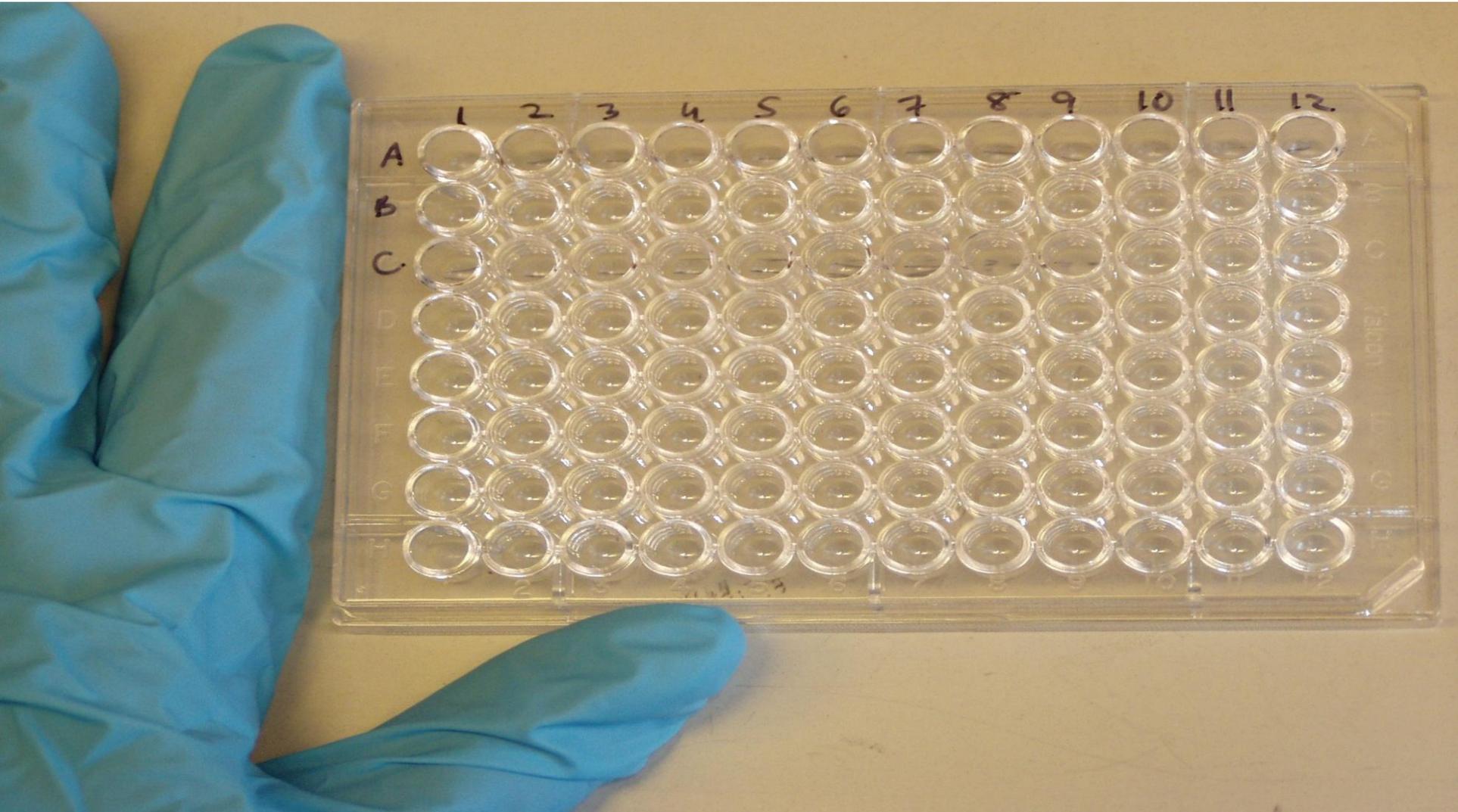
Скрининг на широкий спектр биомаркеров

Специализированные панели на патологические состояния

Цитокины и факторы роста (126 показателей)
Белки сигнальной трансдукции (50 показателей)

- Острая фаза (9 показателей)
- Онкопанель (16 показателей)
- Ангиогенез (9 показателей)
- Диабет (26 показателей)
- Изотипирование АТ (7 показателей)
- Прецизионная цитокиновая панель Pro (10 показателей)

Метод ИФА - реагенты фирмы Dr.Fooke, Германия



Аллергодиагностика (в том числе в стоматологии)

Определение общего и специфических иммуноглобулинов класса E:

- Определение специфических IgE к разнообразным аллергенам (пищевым, пыльцевым, бытовым, грибковым и др.).

- Определение иммуноглобулинов класса E к лекарственным препаратам.
- Определение иммуноглобулинов класса E к зубопротезным материалам.

Показатели гуморального иммунитета в зависимости от
возраста (IgE, МЕ / мл, 1 МЕ/мл = 2.4 нг (1968 г., ВОЗ))

Возраст	Границы нормы
новорожденные	0.09 – 0.53
3 месяца	0.39 – 1.76
6 месяцев	1.09 – 6.69
1 год	1.67 – 7.29
4 года	3.03 – 24.31
7 лет	3.63 – 45.60
10 лет	4.28 – 116.2
взрослые	39.6 – 144.6

ImmunoCAP® - «золотой стандарт» аллергодиагностики in vitro

В аллергодиагностике оборудование и реагенты к нему играют основную роль для получения качественных результатов.

Для этих целей

используется технология

ImmunoCAP®

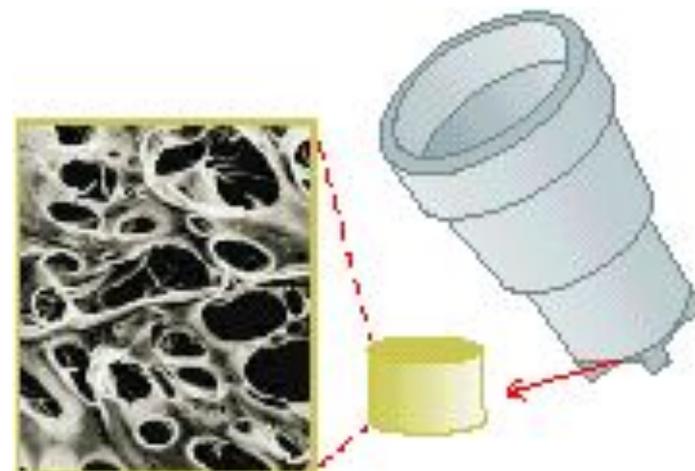
(оборудование и аллергены) фирмы "Phadia«(Швеция), являющейся мировым лидером в данной области.



ImmunoCAP® : иммунофлюоресцентный метод

Связывающая способность : в технологии ImmunoCAP® твёрдой фазой является **трёхмерная активированная целлюлозная губка**, которая связывается с антителами по всему объёму.

Другие технологии, такие как активированные лунки планшета, активированные шарики и активированные бумажные диски для связывания используют **поверхность**, чем обусловлена их значительно меньшая связывающая способность.



Основные принципы оценки иммунограммы

1. Комплексность оценки:

иммунограмма – набор тестов, позволяющих оценить различные звенья иммунной системы.

2. Сравнительная характеристика изменений показателей всех звеньев

иммунной системы (фагоциты, Т-звено, В-звено, гуморальные факторы).

Основные принципы оценки иммунограммы

3. Оценка наиболее выраженный сдвигов иммунологических параметров:
сопоставление полученных показателей у больного с величиной нормальных значений, полученных при обследовании здоровых лиц
(обязательно использовать «возрастные» нормы).

4. Изучение иммунологических показателей в динамике заболевания и в сопоставлении с данными других исследований (микробиологических, вирусологических).

Основные принципы оценки иммунограммы

5. Ведущим в анализе иммунограммы является характеристика клинических симптомов (анализировать иммунограмму должны совместно - лечащий врач и врач клинической лабораторной диагностики).

6. Постановку диагноза «иммунодефицитное состояние» и назначение адекватной иммунотерапии после проведения иммунологического обследования проводит только лечащий врач, а не врач –лаборант, который может лишь фиксировать изменения в отдельных звеньях иммунной системы.

Основные виды патологии иммунной системы

Количественная
или
функциональная
недостаточность
того или иного
звена иммунитета
(иммунодефици
тные состояния).

Нарушения в
распознавании антигена
иммунной системой
(аутоиммунные
заболевания).

Гиперреактивный или
измененный тип
иммунного ответа
(аллергические
заболевания)

Вопросы

- 1. Какие звенья иммунной системы изучаются в клинической практике?
- 2. Какие методы иммунного анализа вам известны?
- 3. Как происходила эволюция методов иммунного анализа?
- 4. Каковы основные принципы оценки иммунограммы?
- 5. Каковы возрастные особенности иммунологических показателей?
- 6. Дайте определение понятию «иммунодефицитные состояния».
- 7. Какие механизмы лежат в основе развития аутоиммунной патологии?
- 8. Какие виды гиперчувствительности Вам известны?
- 9. Какие виды аллергических заболеваний вам известны?
- 10. Перечислите основные клетки-эффекторы аллергии.

Тестовые вопросы

В лабораторной диагностике в зависимости от детализации анализа отклонений тесты иммунного анализа подразделяются на:

- . тесты I уровня
- . тесты II уровня
- . тесты III уровня
- . тесты IV уровня
- . тесты V уровня

Объектом иммунологических исследований могут служить:

- . кровь
- . слюна
- . мокрота
- . спинномозговая жидкость
- . жидкость бронхоальвеолярного лаважа

Тестовые вопросы

К современным методам иммунного анализа не относятся:

1. Иммуноферментный анализ
2. Иммунофлюоресцентный анализ
3. Иммунофенотипирование
4. Хемилюминесцентный анализ
5. Методы розеткообразования

Моноклональные антитела получают:

1. При иммунизации лабораторных животных разными антигенами
2. Путем слияния нормальных продуцирующих антитела В-лимфоцитов с опухолевой линией клеток и образованием гибридом
3. Путем замораживания плазматических клеток
4. С помощью фракционирования клеток
5. С помощью центрифугирования клеток на градиенте плотности ($\rho=1.0770$)

Тестовые вопросы

В каком возрасте начинают проявляться врожденные иммунодефицитные состояния гуморального звена?

1. В возрасте 2 недель
2. В возрасте 1 месяц
3. В возрасте 2 месяца
4. В 3-месячном возрасте
5. В возрасте от 4 месяцев

Какие из перечисленных причин иммунодефицитных состояний не относятся к первичным:

1. Нарушение активности или отсутствие фермента
2. Отсутствие какой-либо популяции клеток иммунной системы
3. При дефектах генов, кодирующих молекулы адгезии
4. Иммунодефицитные состояния, вызванные вирусами
5. Иммунодефицитные состояния, вызванные иммунодепрессантами

Тестовые вопросы

К основным причинам вторичной иммунологической недостаточности не относится:

1. Белковое голодание
2. Нефротический синдром (гипопротеинемия)
3. Применение иммунодепрессантов
4. Дефекты генов, кодирующих адгезионные молекулы
5. Хрониостресс

Какой тип гиперчувствительности лежит в основе развития заболеваний:

1. Атопический дерматит
2. Аллергический ринит
3. Атопическая бронхиальная астма
4. Аллергический конъюнктивит
5. Атопическая крапивница

Тестовые вопросы

Какие заболевания не относятся к «аллергическим»?

1. Атопический дерматит
2. Аллергический ринит
3. Атопическая бронхиальная астма
4. Аллергический конъюнктивит
5. Неиммунологическая крапивница

В развитии каких аутоиммунных заболеваний преимущественное участие не принимают механизмы гиперчувствительности II типа?

1. Аутоиммунная гемолитическая анемия
2. Болезнь Грейвса
3. Миастения гравис
4. Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура
5. Системная красная волчанка