



ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кафедра внутрішніх хвороб-3

On-Line курс:

СУЧАСНІ ПИТАННЯ КЛІНІЧНОЇ ІМУНОЛОГІЇ ТА АЛЕРГОЛОГІЇ

Змістовий модуль 2.

Клінічна імунологія

Тема заняття № 4:

**Комплексний підхід до оцінки
імунного статусу людини.
Імунограма**

ИММУННЫЙ СТАТУС

это совокупность количественных и функциональных показателей, отражающих состояние иммунной системы человека в данный момент времени

ЦЕЛИ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА

1. Полная оценка состояния здоровья.
2. Выявление дисфункций иммунной системы.
3. Выявление различных заболеваний, в патогенезе которых возможны иммунные нарушения.
4. Выявление генетически опосредованных дефектов иммунной системы.
5. Контроль действия "факторов вредности".
6. Изучение состояния до и после вакцинации в группах риска.
7. Контроль иммуномодулирующей, иммуносупрессивной и цитостатической терапии.
8. Изучение острых и хронических инфекций различной этиологии, в том числе СПИД.
9. Выявление аутоиммунных, иммунокомплексных, аллергических болезней.
10. Выявление лимфопролиферативных и других злокачественных новообразований.
11. Обследование реципиентов до и после трансплантации.

ЦЕЛИ ИММУНОДИАГНОСТИКИ

- **ОЦЕНКА НЕИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ**
(использование методов иммунохимического анализа для определения гормонов и других физиологически значимых молекул в сыворотке крови и других биологических субстратах)
- **ОЦЕНКИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ С ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЦЕЛЬЮ** (характеристика региональных особенностей иммунитета, его связей, HLA-генотипа, при выявлении эффектов экологических факторов среды)
- **ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ (ИММУННОГО СТАТУСА)** необходимо и оправдано лишь в тех случаях, когда ее результаты позволяют уточнить диагноз и повлиять на выбор тактики лечения

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

- **T-и B-лимфоциты:** розеткообразование с эритроцитами барана, иммуногистохимический тест с МАТ, цитофлюориметрии с МАТ, РБТЛ с аутоантигенами, торможения миграции с митогенами, определение клеточной цитотоксичности.
- **Натуральные киллеры:** радиоиммунный, иммуногистохимический, проточная иммунофлюороцитометрия.
- **Фагоцитирующие клетки:** иммунофлюорисцентный метод, радиоиммунный, иммуноферментный, тесты поглощения и киллинга микроорганизмов, метаболическая активниисть фагоцитив.
- **Гуморальной иммунитет** изучают методами, которые основываются на реакциях агглютинации (иммунофлюорисценция, тест нейтрализации, торможения агглютинации, агглютинация Бой-дена, антиглобулиновый тест), преципитации в растворах и твердых средах (иммунодиффузии, иммуноэлектрофорез).
- **Определении антигенов и антител** проводится радиоиммунным, иммунофлюорисцентным, иммуноферментным и полимеразной цепной реакцией.

УРОВНИ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОИСКА В ЛАБОРАТОРНОЙ ИММУНОЛОГИИ

УРОВЕНЬ 1

Скрининговое
обследование

Определение

- Общее количество ЛЦ, Т- и В-ЛЦ, НК-клеток;
- Ig различных классов (IgA, IgM, IgG);
- Фагоцитарная активность нейтрофилов (ФЧ, ФИ);
- Определение титра комплемента

УРОВЕНЬ 2

Расширенная
иммунограмма

Исследование

- Субпопуляций Т-и В-ЛЦ
- Тест торможения миграции лейкоцитов;
- Оценка пролиферативной активности Т- и В-лимфоцитов на митогены, антигены, аллогенные клетки (РБТЛ)
- Оценка активности К— и ЕК-клеток
- Выявление ЦИК
- Определение компонентов комплемента
- Оценка различных этапов фагоцитоза и рецепторного аппарата фагоцитов.
- Тесты по определению цитокинов, в том числе продукции и рецепции интерлейкинов.
- Анализ генов, ответственных за экспрессию иммунологически значимых молекул.
- Определение специфических Ig Е.
- НСТ-тест.
- Другие исследования состояния иммунной системы

ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОГРАММЫ В ПОКОЕ

КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ

Т-лимфоциты (Т-РОК, Е-РОК)	CD3	50-70% (0,6-1,5 тыс.)
В-лимфоциты (В-РОК, ЕАК-РОК)	CD19	9 - 20% (0,3 - 0,5 тыс.)
Теофиллин резистентные, (ТФР-РОК)	CD4	50-65%
Теофиллин чувствительные (ТФЧ-РОК)	CD8	18-22%
Нулевые лимфоциты (В - клетки)	NK CD16	12 -26,0%

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ

IgA		
IgM	0,7 -2,5	
IgG	7,0 -14	
IgE (иммуноферментный метод)		до 100МО/мл
ЦИК		до 20 - 100 усл. От

ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ

С лактексом	47,5-79%
Фагоцитарное число	3-6
Критический уровень общего количества лимфоцитов	1,5 г / л
Нейтрофилы / лимфоциты	2,5

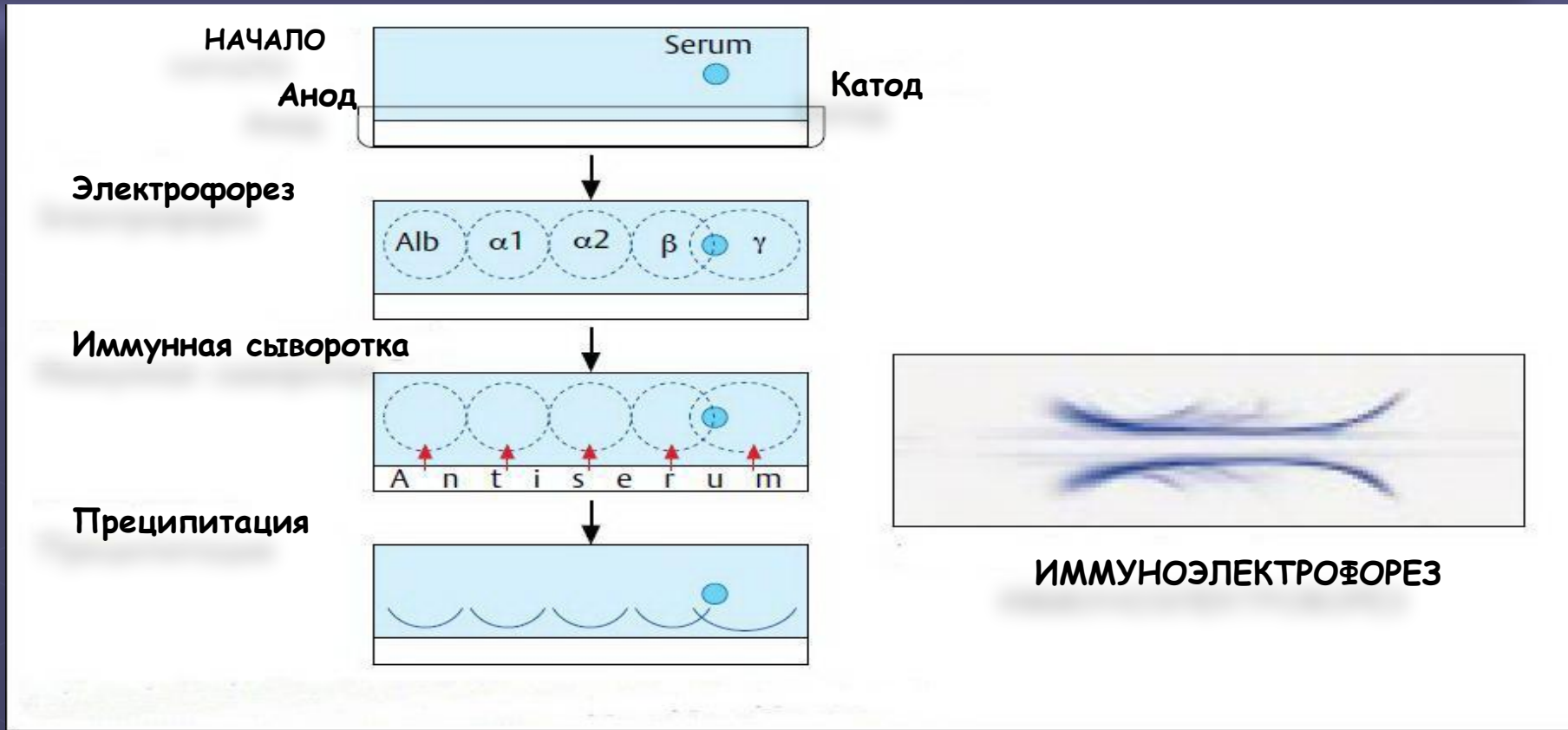
ТЯЖЕСТЬ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

- **I степень** - может клинически проявляться, лабораторные показатели изменены 15-29%
- **II степень** - клинически подострый или хронический ход, лабораторные отклонения 30-59%
- **III степень** - острый, подострое течение, с инфекционным синдромом, или комбинацией синдромов, лабораторные отклонения 60%

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИНТЕРПРЕТАЦИИ ИММУНОГРАММ

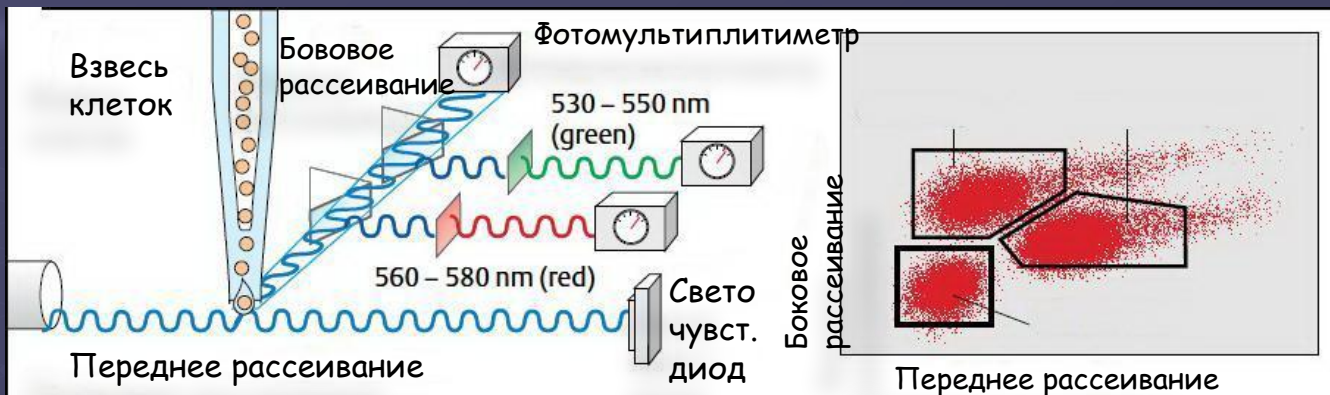
- С учетом клинических данных (клиническая картина ведущая в диагностике !!!)
- Комплексный анализ всех показателей
- Ориентироваться на устойчивые выраженные сдвиги иммунограммы
- Динамическая оценка
- Возможность атипичности иммунограммы
- Иммунограмма - ориентировочный д-з

1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgA, IgG И IgM

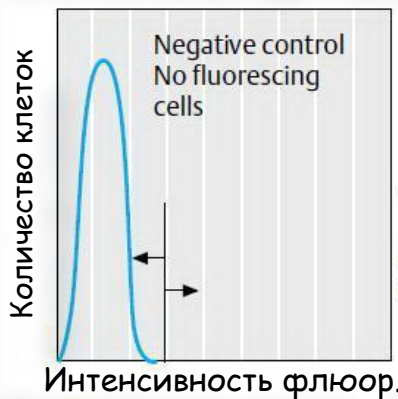


- Электрофорез (зональный, иммуноЭФ, ЭФ с иммунофиксацией)
- Простая и двойная радиальная иммунодиффузия
- Нефелометрия
- РИА
- Твердофазный ИФА
- Иммуноблоттинг
- Непрямая иммунофлюоресценция
- Реакции агглютинации

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ АНТИГЕНОВ ЛИМФОЦИТОВ – CD



ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛОУМЕТРИЯ



Гистограмма

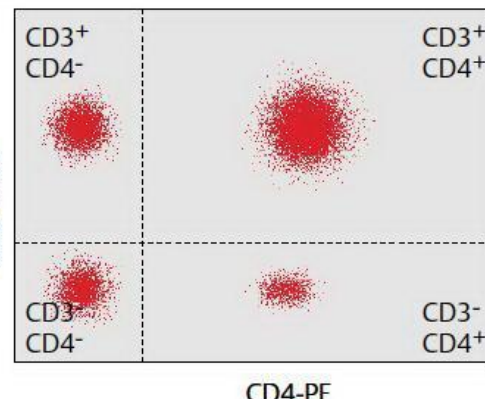
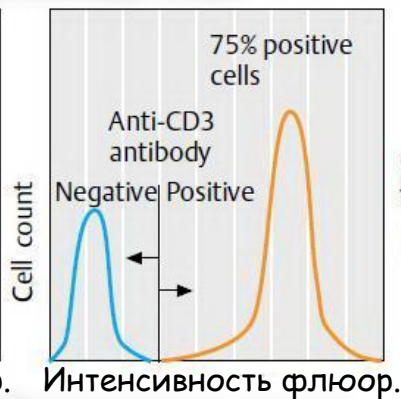


График 2х цветного анализа

- Моноклональные антитела
- Флюорохромы
- Проточная цитофлуориметрия

3. ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ

- Иссл. функций В-лимфоцитов *in vivo*, *in vitro*
 - ✓ определения уровня иммуноглобулинов в сыворотке
 - ✓ определение уровня подклассов IgG
 - ✓ определение антител к белковым и полисахаридным антигенам
- Иссл. функций Т-лимфоцитов *in vitro*, *in vitro*
 - ✓ абсолютное число лимфоцитов
 - ✓ способность Т-лимфоцитов вызывать аллергическую реакцию замедленного типа
 - ✓ пролиферативную активность
 - ✓ оценка цитотоксичности
 - ✓ исследование цитокинов
- Исследование функций NK-лимфоцитов
 - ✓ цитотоксическую активность
 - ✓ активация NK-лимфоцитов цитокинами

4. ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИЙ ФАГОЦИТОВ

- **Исследование моноцитов и макрофагов**
 - ✓ представление антигена Т-ЛЦ
 - ✓ АТ-зависимая цитотоксичность
 - ✓ противоопухолевая цитотоксичность
 - ✓ хемотаксис
 - ✓ фагоцитоз
 - ✓ оценка бактерицидной активности нейтрофилов
- ✓ **Исследование функций нейтрофилов**
 - ✓ хемотаксис нейтрофилов
 - ✓ продукция свободных радикалов кислорода
 - ✓ оценка бактерицидной активности нейтрофилов
 - ✓ исследование молекул адгезии (CD11a, CD11b, CD11c и CD18)

5. ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТА

- Определение гемолитической активности комплемента
- Определение компонентов комплемента
- ✓ количественное с помощью простой радиальной иммунодиффузии и нефелометрии
- ✓ функциональные исследования отдельных компонентов комплемента в сыворотке
- ✓ Выявление C3 и продуктов его расщепления
- ✓ Выявление с помощью C1q

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИК

7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ IgE

- Общий уровень IgE (РИА)
- Специфические IgE (клжные пробы)
- Реакции высвобождения гистамина тучными клетками

8. МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

- метод качественной ПЦР при типировании HLA, особенно II класса
- ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (для оценки уровня экспрессии генов, в том числе кодирующих иммунологически значимые молекулы)
- ✓ количественное с помощью простой радиальной иммунодиффузии и нефелометрии
- ✓ функциональные исследования отдельных компонентов комплемента в сыворотке
- ✓ Выявление C3 и продуктов его расщепления
- ✓ Выявление с помощью C1q

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

1. Фагоцитарная активность клеток

- микроскопически, в окрашенных мазках, с использованием в качестве фагоцитируемых частиц как МО, так и инертных корпускул (расчитывают ФЧ и ФИ)
- проточная цитометрия с применением объектов фагоцитоза (бактерий, частиц), меченых флуорохромами

2. Оценка бактерицидности фагоцитов

- теста на завершенность фагоцитоза
- варианты метода, основанные на проточной цитометрии
- реакции восстановления нитросинего тетразолия
- хемоллюминесценция

3. Оценка секреции провоспалительные цитокины

- постановка теста *in vitro* со стимуляцией лейкоцитов крови или выделенных макрофагов бактериальными стимуляторами с последующим иммуноферментным определением цитокинов

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

4. Характеристики естественных киллеров

- проточная цитометрия с выявляют мембранные молекулы CD56 и CD16
- радиометрическая оценка функциональной активности естественных киллеров
- Цитофлуорометрическая оценка цитотоксических клеток по мембранной экспрессии молекулы CD107 (LAMP-1)

5. Оценка состояние системы комплемента

- теста на завершенность фагоцитоза
-

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА

1. Определение реализующих клеток

- Суммарная популяция Т-лимфоцитов (CD3) и 2 их основные субпопуляции (CD4 и CD8) с помощью моноклональных антител
- Суммарная популяция В-лимфоцитов (CD19), их мембранные κ- и λ-цепи

2. Оценка функциональной активности лимфоцитов

- Методы измерения пролиферативного ответа лимфоцитов (в основном Т-клеток) на митогенную стимуляцию
- Оценка пролиферации по включению 3H-тимидина или тест на разбавление флуоресцентной метки CFSE с использованием проточной цитометрии

3. Подсчет клеток, вступающих в апоптоз

- цитофлуорометрический подход с окрашиванием клеток пропидия йодидом

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА

5. Оценка реактивности клеточных клонов

- Тест торможения миграции лейкоцитов

6. Оценка секрецию Th1-клетками IFN γ

- Методом ELISPOT

7. Оценка функции цитотоксических Т-лимфоцитов

- С помощью тех же подходов, которые используют для функциональной оценки НК-клеток

8. Оценка пролиферативного потенциала В-лимфоцитов

- оценивают их пролиферативный ответ на действие митогена лаконоса

ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

I СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АЛЛЕРГОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

установление сенсibilизации к
аллергену

II ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ АЛЛЕРГОЛОГИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

установление лабораторными
методами патогенетических
изменений, типичных для
аллергического заболевания

МЕТОДЫ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

1. Элиминационный тест

- оценке состояния пациента после прекращения контакта с аллергеном (чаще при пищевой и лекарственной аллергии)

2. Кожный, накожный, скарификационный, тест-уколом (prick-тест), внутрикожные тесты .

- для определения спектра сенсибилизации у пациентов с atopическими заболеваниями, а также выявления сенсибилизации к бактериальным аллергенам

3. Внутрикожные тесты

- для выявления сенсибилизации к аллергенам бактериального и грибкового происхождения

4. Аппликационные (patch-) тесты

- дифференциальной диагностики аллергического и неаллергического контактного дерматита, выявления профессиональных контактных аллергических заболеваний, аллергию к латексу

ЛАБОРАТОРНЫЕ КРИТЕРИИ ДИСФУНКЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Параметры	Уровень
Лейкоциты периферической крови	<4,0 или >10x10 ⁹ /л
Абсолютное количество лимфоцитов	Ремиссия: <1,5 или >2,5x10 ⁹ /л Обострение: <2,0 или >3,4x10 ⁹ /л
Уровень нейтрофилов\ЛЦ(НИ)	<2,5 или >3
Активность фагоцитов: ФИ	<40 или >60%
ФЧ	<4 или >9
Лимфограмма: CD3	<45%
CD20	<10%
CD16	<10%
CD4	<30%
CD8	<12%
Иммунорегуляторный индекс (CD4/CD8)	<1,5 или >3
Иммуноглобулины (ИФА): IgG	<7,0 г/л
IgM	<0,7 г/л
IgA	<1,0 г/л
IgE	>150 МЕ/мл